

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Kállai Judit

**Antithrombin deficienciát okozó *SERPINC1* mutációk
karakterizálása**

DEBRECENI EGYETEM

LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Antithrombin deficienciát okozó *SERPINC1* mutációk
karakterizálása**

Kállai Judit

Témavezető: Dr. Bereczky Zsuzsanna



**DEBRECENI EGYETEM
LAKI KÁLMÁN DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2024**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1 A <i>SERPINC1</i> gén és az antithrombin fehérje szerkezete.....	9
2.2 Az antithrombin fehérje szerepe a véralvadásban és egyéb funkciói	10
2.3 Az antithrombin deficiencia.....	14
3. Célkitűzés.....	22
4. Betegek és Módszerek	23
4.1 Antithrombin deficiens betegek klinikai és rutin laboratóriumi jellemzése	23
4.2 Antithrombin deficiens betegek <i>SERPINC1</i> génmutáció analízise	23
4.3 Keresztezett Immuno elektroforézis (Crossed Immuno electrophoresis CIE)	24
4.4 Nano DSF.....	24
4.5 A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék in vitro expressziója	25
4.6 A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék stabil transzfekciója.....	27
4.7 In vitro expresszált rekombináns antithrombin fehérjék és plazmából származó (normál és ATBp3 homozigóta) antithrombin tisztítása affinitás kromatográfiával	28
4.8 Felületi Plazmon Rezonancia (SPR-Surface Plasmon Resonance)	28
4.9 A rekombináns antithrombin fehérjék AT antigén és aktivitás mérései.....	29
4.10 N-glikozidáz F emésztés	30
4.11 Western blot	30
4.12 RT-qPCR.....	31
4.13 In silico módszerek	32
4.13.1 ATD II heparin-kötőhely (IIHBS) mutációk (ATBp3, AT Basel, AT Padua) vizsgálata in silico módszerekkel.....	32
4.13.2 <i>SERPINC1</i> gén misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója 33	
5. Eredmények	34
5.1 Antithrombin Budapest 3, Basel, és Padua mutációk vizsgálatának eredményei....	34
5.1.1 A heparin kötőhelyet érintő mutációt hordozó betegek klinikai és laboratóriumi jellegzetességei.....	34
5.1.2 A vad típusú és a Budapest 3 homozigóta antithrombin hőstabilitása.....	38
5.1.3 Heparin kötő képesség vizsgálatának eredményei.....	39
5.1.4 A vad típusú és a három IIHBS típusú mutáns AT fehérje in silico modellezése.....	41
5.1.4.1 A 22-46 hurok konformációja.....	41

5.1.4.2	Az antithrombin fehérje N-terminális részének DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) analízise	43
5.1.4.3	Root Mean Square Fluctuations (RMSF) analízis	43
5.1.4.4	Az allosztérikus útvonalak vizsgálata	45
5.1.4.5	A pentaszacharid kötés vizsgálata Root Mean Square Deviations meghatározással	45
5.2	A kilenc új antithrombin mutáns vizsgálatának eredményei	46
5.2.1	Az antithrombin deficiens betegek klinikai és laboratóriumi jellegzetességei	46
5.2.2	Antithrombin szekvencia homológia vizsgálatának eredménye	51
5.2.3	A misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója	52
5.2.4	A vad típusú és a kilenc mutáns AT kimutatása a transzfektált sejtek sejtlizátumából és a felülúszóból Western blot technikával	55
5.2.5	Valós idejű kvantitatív PCR analízis eredménye	57
5.2.6	Antithrombin antigén szintek a HEK-293 sejtekben expresszálatott vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék esetében	58
5.2.7	A HEK-293 sejtekben expresszálatott vad típusú és mutáns AT fehérjék AT aktivitása	59
5.2.8	A p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr mutáns antithrombin fehérjék heparin-kötő képességének jellemzése	61
5.2.9	A mutáns AT fehérjék N-glikozidáz F emésztése	62
6.	Megbeszélés	63
6.1	Antithrombin Budapest3, Basel és Padua mutációk vizsgálatával kapott eredmények összefoglalása	63
	7.táblázat: Antithrombin Budapest3, Basel és Padua mutációk vizsgálatával kapott eredmények táblázatos összefoglalása	67
6.2	A kilenc új antithrombin mutáció biokémiai következményeinek összefoglalása ..	67
7.	A jelölt saját eredményei, új megállapításai	73
8.	Összefoglalás	75
9.	Summary	77
10.	Irodalomjegyzék	78
11.	Tárgyszavak	86
12.	Köszönetnyilvánítás	87
13.	Függelék	88
13.1	Megjelent publikációk listája	88
13.2	Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai	91

Rövidítések jegyzéke

AT – antithrombin, antithrombin

ATBp3 – antithrombin Budapest 3 mutation, antithrombin Budapest 3 mutáció

AT Basel – antithrombin Basel mutation, antithrombin Basel mutáció

AT Padua – antithrombin Padua mutation, antithrombin Padua mutáció

ATD – antithrombin deficiency, antithrombin deficiencia

ATE – arterial thrombotic event, artériás thromboembolia

CIE – Crossed Immunoelectrophoresis, Keresztezett immunoelektroforézis

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, Dulbecco's Modified Eagle Médium

DNS – deoxyribonucleic acid, dezoxi-ribonukleinsav

DSF - Differential Scanning Fluorimetry, Differenciál Scanning Fluorimetria

DSSP – Define Secondary Structure of Proteins, Fehérjék másodlagos szerkezetének meghatározása

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Enzimhez kötött immunszorbens assay

ER – endoplasmic reticulum, endoplazmatikus retikulum

FBS – fetal bovine serum, szarvasmarha magzati szérum

FIIG20210A – prothrombin gene 20210G>A, protrombin gén 20210G>A

FVL – Factor V Leiden polymorphism, Faktor V Leiden polimorfizmus

FXa – active factor X, aktív X-es faktor

GAMD – Gaussian Accelerated Molecular Dynamics, Gaussian Accelerated Molekuláris Dinamika

II HBS –Type II antithrombin deficiency affect the heparin binding site, heparin kötőhelyet érintő II-es típusú antithrombin deficiencia

hc-anti-FXa – heparin cofactor anti FXa, heparin-kofaktor-anti-FXa

HEK-293 – Human embryonic kidney-293 cells, Humán embrionális vese-293 sejtek

HGMD – Human Gene Mutation Database, Humán Gén Mutációs Adatbázis

HGVS – Human Genome Variation Society, Humán Genom Variáció Egyesület

LMWH – low molecular weight heparin, kis molekulásúlyú heparin

MD – Molecular Dynamics, Molekuláris Dinamika

MVT – deep vein thrombosis, mélyvénás thrombosis

p-anti-FXa – progressive anti-FXa, progresszív anti-FXa

PCR – Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció

II PE – Type II antithrombin deficiency with pleiotropic effect, pleiotróp hatású II-es típusú antithrombin deficiencia

PNGase F – Peptid-N-glycosidase F, Peptid-N-glikozidáz F

RMSD – Root Mean Square Deviations, gyök-átlagos négyzetes eltérés

RMSF – Root Mean Square Fluctuations, gyök-átlagos négyzetes fluktuáció

RNS - ribonucleic acid, ribonukleinsav

II RS – Type II antithrombin deficiency affect the reactive site, reaktív helyet érintő II-es típusú antithrombin deficiencia

RT – real-time, valós idejű

SD – Standard Deviation, szórás

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis, nátrium dodecil szulfát poliakrilamid gél elektroforézis

SERPINC1 – gene of the antithrombin protein, az antithrombint kódoló gén

SPR – Surface Plasmon Resonance, Felületi Plazmon Rezonancia

TE – thrombotic episode, thromboticus esemény

TMB – 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine, 3,3',5,5'-tetrametil-benzidin

TTBS - Tween 20-Tris buffered saline, Tween-20-at tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldat

VKA – vitamin K antagonist, K-vitamin antagonista

VTE – venous thromboembolism, vénás thromboembolia

WB – Western blot, Western blot

WT – wild type, vad típus

1. Bevezetés

A hemosztázis lehetővé teszi, hogy a vér az érpályán belül megtartsa folyékony állapotát, abból kikerülve viszont megszilárduljon, ezzel megakadályozva, hogy egy érfal sérülés elvérzést okozzon. A hemosztázis kényes egyensúlyának felbomlása súlyos következményekkel jár, ezek egyik véglete a vérzékenység a másik a thrombosis.

Thrombus képződéshez három tényező megváltozása vezethet, melyet Rudolf Virchow, német patológus fogalmazott meg először a XIX. században. A három tényező a véráramlás (sztázis), az érfal (érfal rendellenessége) vagy a vér alvadékonyságának (hypercoagulabilitás) a megváltozása. A hypercoagulabilitáshoz vezető veleszületett tényezők közé tartoznak az antithrombin (AT), protein C és S (PC, PS) deficienciák, az aktivált protein C rezisztencia (APC rezisztencia, melynek fő oka a FV Leiden mutáció, p.Arg506Gln), a protrombin gén (F2) 20210A allél és egyes dysfibrinogenaemiák. Ezek az állapotok fokozott vénás thromboembolia (VTE) kockázatot okoznak. A VTE kockázatát növeli továbbá a hyperhomocysteinaemia, illetve az antifoszfolipid szindróma, melyben lupus anticoagulans és anticardiolipin antitestek jelenléte mutatható ki a keringésben.

Az AT a szerin proteáz inhibitorok (SERPIN) családjába tartozó, a májban szintetizálódó glikoprotein, melynek fő feladata a thrombin és az aktivált X-es faktor gátlása. A thrombin enzimatis aktivitása a plazma antithrombinjához való kötődését követően megszűnik. Ez önmagában lassú folyamat, melyet a heparán-szulfát proteoglikánok és a heparin akár 500-szorosára gyorsíthatják. A vérplazma antithrombin szintjének csökkenése növeli a thrombosis veszélyét [1].

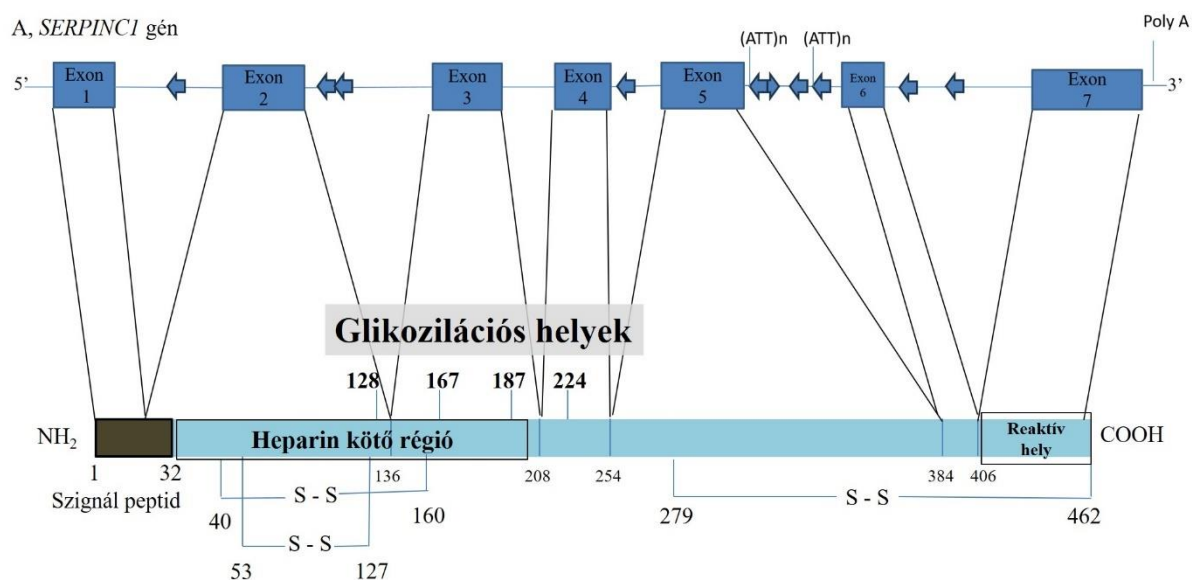
Az antithrombin deficiencia (ATD) a súlyos thrombophiliák közé tartozik, az első esetet Egeberg és munkatársai közölték 1965-ben [2]. Ezt követte az első funkcionális AT deficiencia (AT Budapest) leírása, mely 1974-ben Sas és munkatársai nevéhez fűződik [3]. Az ATD-t két csoportra oszthatjuk fel, az I-es típusú (kvantitatív) és a II-es típusú (kvalitatív) csoportra. A II-es típust tovább bonthatjuk 3 alcsoportra a defektus elhelyezkedése szerint, úgymint a reaktív helyet érintő (IIRS), a heparin kötő helyet érintő (IIHBS) vagy pleiotróp hatású (IIPE) [4]. A Human Gene Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>, utolsó belépés 2023. november 11) alapján 529 különböző mutációt írtak le eddig a *SERPINC1* génben. A mutációk részletes klinikai és molekuláris karakterizálása értékes információkat szolgáltat a betegség patofiziológiájának megértéséhez, új mutációk esetén a patogenitás igazolása után hozzájárulhatunk az adatbázisok bővítéséhez.

Jelen tanulmány első része három ismert IIHBS típusú mutáció (ATBp3, AT Basel, AT Padua) részletes biokémiai, különös tekintettel a heparin kötés vizsgálatára, és magas szintű *in silico* módszerekkel nyert eredményeit mutatja be. Korábbi tanulmányok már vizsgálták külön-külön a három IIHBS mutáció abnormalis AT-heparin kölcsönhatását. Az AT Basel mutációról leírták, hogy kapcsolatba hozható artériás thrombosisal, és heparin-Sepharose affinitás kromatográfiával egy rendellenes csúcsot mutat [5]. Bebizonyították továbbá, hogy monoklonális antitest alapú heparin kötési affinitás vizsgálatban az AT Basel 40-szeres csökkenést mutat a normál AT-hoz képest [6]. Az AT Padua mutáció egy tanulmány szerint 30-szoros csökkenést eredményez a heparin kötésben [7]. Az ATBp3 esetében is több cikket találunk redukált heparin kötő képességéről [8], [9]. A három mutációt együtt vizsgáló, és a heparin kötésüket egységes módszerekkel összehasonlító tanulmány eddig még nem született. Az értekezés második része kilenc új (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr), irodalomban eddig nem szereplő, AT mutáció klinikai és biokémiai jellemzését, patogenitásuk igazolását írja le. Ehhez hasonló, új AT mutációk részletes *in vitro* karakterizálását bemutató vizsgálatból csak kevés található az irodalomban [10], [11], [12], [13], [14].

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A *SERPINC1* gén és az antithrombin fehérje szerkezete

A humán AT génje a *SERPINC1* az egyes kromoszómán helyezkedik el az 1q23-q25.1 pozícióban, hét exont és hat intront tartalmaz, hossza 13,5 kilobázis (1. ábra A). Az AT heparin kötő részét a második és a harmadik exon kódolja, a C-terminális részen elhelyezkedő reaktív helyet a hetedik exon. Kilenc teljes és egy részleges Alu ismétlődő szakaszt azonosítottak az 1, 2, 4, 5 és 6-os intron esetében [1], [15]. Az AT fehérje a szerin proteáz inhibitorok (SERPIN) családjába tartozó egyláncú glikoprotein, molekulatömege 58 kDa (1. ábra B). A májban szintetizálódik, a vérkeringésben koncentrációja kb. 250 µg/ml, féléletideje 2-3 nap. A 32 aminosav hosszúságú szignálpeptid lehasadása után az érett fehérje 432 aminosavból áll és három belső diszulfid hidat tartalmaz (Cys40-160, Cys53-127 és Cys279-462). A fehérje érése során az endoplazmatikus retikulumban (ER) N-glikoziláció megy keresztül és négy aszparagin reziduumon (Asn128, 167, 187 és 224) N-glikozilált lesz.



B, Antithrombin protein

1. ábra: A *SERPINC1* gén (A) és az antithrombin fehérje szerkezete (B)

Az ábra Perry D.J. és Carrell R.W. 1996-os cikke alapján készült [16].

A keringésben 2 glikoforma van jelen, 90-95%-ban az α -glikoforma és kevesebb, mint 10% -ban a β -glikoforma. A β -AT Asn167-es reziduumán a glikoziláció hiányzik, ennek következtében erősebben kötődik a heparinhoz és hasonló molekulákhoz. Például a heparán-szulfáthoz, mely az endothel sejtek felszínén és a legtöbb sejtben is jelen van. Az AT jellegzetes másodlagos és harmadlagos szerkezettel rendelkező szerin proteáz inhibitor, mely 9 α hélixet (A – I) és 3 β redőt (A – C) tartalmaz. A reaktív központi hurok (reactive center loop RCL) a molekula tetején helyezkedik el, ez a rész tartalmazza a szerin proteázok aktív helyével komplementer szekvenciákat [1]. A SERPIN-ek jelentős strukturális flexibilitással rendelkeznek, a szerkezetükben bekövetkező változások hozzájárulnak a szerin proteázok gátlásához [17, 18]. Hasítatlan állapotban két fő konformációs állapotot különböztetünk meg, a natív és a látens formát. A natív forma esetében a reaktív központi hurok az AT molekula felszínén helyezkedik el, a látens konfigurációnál a RCL a β redők közé kerül be. A látens forma termodinamikailag stabilabb, mégis a keringésben a natív, magasabb energiaszinten csapdába esett forma van jelen. A pentaszacharid vagy pentaszacharid egységet tartalmazó heparin kötése konformációs változásokat okoz az RCL-ben és annak közelében. A pentaszacharid egység és az AT közötti kölcsönhatás két lépésben játszódik le, egy kezdeti gyengén kötött intermedier alakul át erősen kötött formává [19], [1].

2.2 Az antithrombin fehérje szerepe a véralvadásban és egyéb funkciói

A véralvadás fiziológias szabályozása szükségessé teszi a thrombin keletkezésének és hatásának időbeli és térbeli korlátozását. A fiziológias inhibitorok örökletes hiánya vagy diszfunkciója fokozott thrombosis kockázattal járhat. A véralvadás inhibitorrendszerét különböző proteáz inhibitorok (antithrombin, α_1 -antitripszin, α_2 -makroglobulin, Tissue factor pathway inhibitor és a heparin kofaktor II) alkotják, melyek megtalálhatóak a vérkeringésben, a vérplazmafehérjék több mint 10 %-át teszik ki. Hatásmechanizmusuk kétféle lehet: az egyik mechanizmus esetében az enzim kötődik az inhibitorhoz, de az enzim aktív centruma működőképes marad (például α_2 -makroglobulin), a másik mechanizmus során kovalens kötés jön létre az enzim aktív centruma és az inhibitor között. Így működik az AT, α_1 -antitripszin és a heparin kofaktor II. Mindhárom inhibitor a véralvadási szerin-proteázok szubsztrátjaként fogható fel. A gátolandó enzim ekvimoláris komplexet hoz létre az inhibitorral, így további funkciót kifejteni nem lesz képes. Az AT gátló hatása legkifejezettebb a thrombin és az aktív X-es faktor (FXa) irányába, de egyéb szerin proteáz alvadási faktorokat is gátol. Az AT

molekula nagy affinitással kötődik heparinhoz vagy heparán-szulfát proteoglikánokhoz. Ez a kötődés az AT gátló hatását az aktivált koagulációs faktorokra (pl. thrombin, FXa) nagymértékben felerősíti (2. ábra).

A thrombin gátlása során az AT és a thrombin is nagy affinitással kötődik a heparinhoz, majd azon az enzim aktív centruma és az inhibitor között kovalens kötés jön létre (a thrombin gátlódik). E kölcsönhatás heparin nélkül is bekövetkezik, de heparin jelenlétében sokkal nagyobb reakciósebességgel. Mivel a már kialakult thrombin-antithrombin komplex affinitása a heparinhoz kicsi, a heparin szabaddá válik és beléphet újra egy következő reakcióba. A FXa gátlásának mechanizmusa kissé eltér a thrombin gátló mechanizmustól, itt nincs szükség arra, hogy a FXa heparinhoz kötődjön, így ennek gátlása rövidebb szacharidos egységek jelenlétében is hatékonyan bekövetkezik (LMWH, vagy pentaszacharid jelenléte elég). A thrombin gátlásához – mivel annak heparinhoz kötődnie kell – legalább 18 szacharidos egységből álló heparin jelenlétére van szükség.

Az AT elsődleges funkciója tehát a thrombin mediált fibrin alvadék kialakulásának megakadályozása és a FXa által létrehozott thrombin generáció megfékezése, illetve az ún. intrinzik és extrinzik útvonalon szereplő egyéb aktivált alvadási faktorok (FIXa, FXIa, FXIIa, FVIIa-szöveti faktor komplex) gátlása [20], [21], [22], [4], [1].

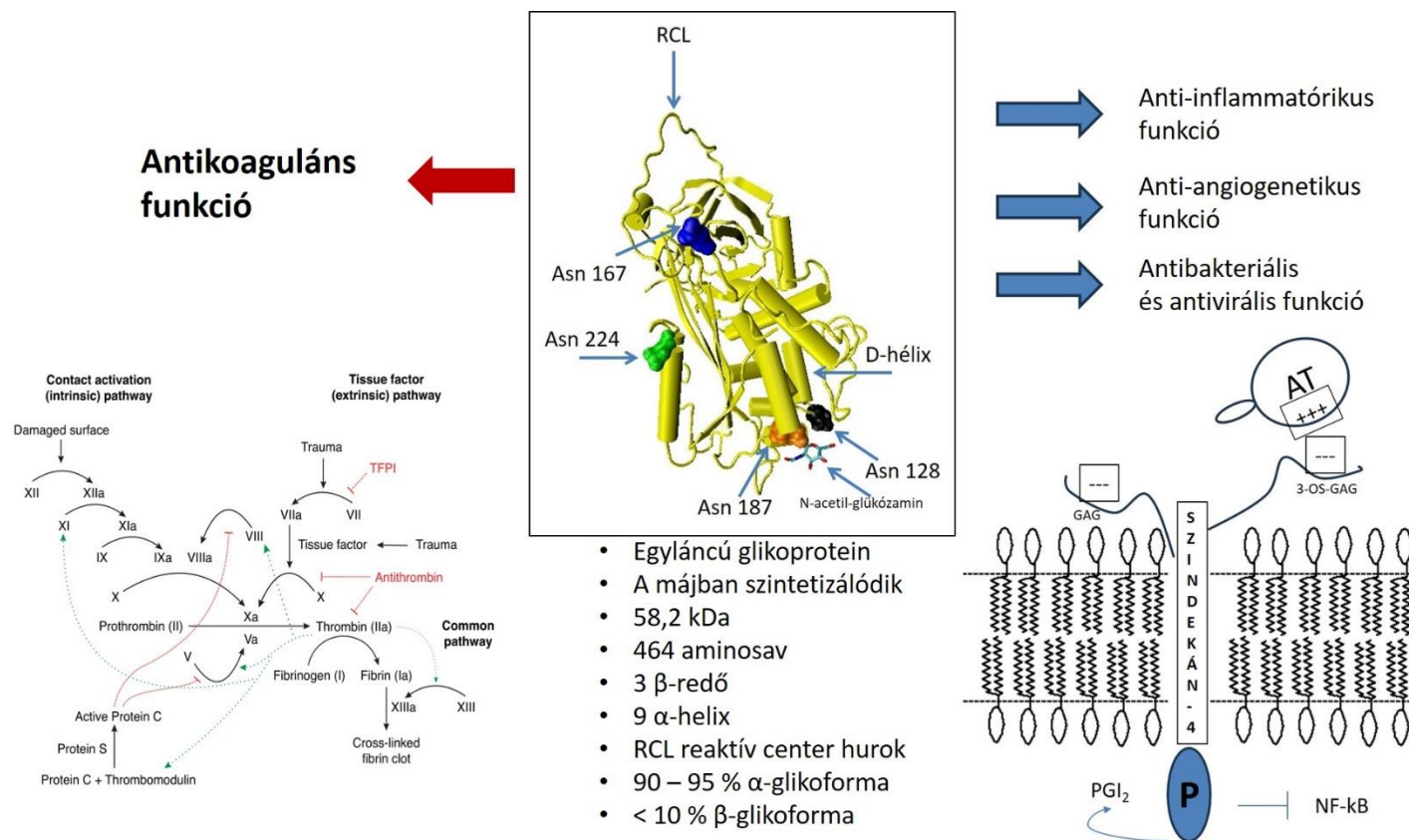
Az AT hatást jelentősen gyorsító tulajdonsága miatt a heparin már több évtizede az egyik leggyakrabban használt gyógyszer a thromboemboliás betegségek megelőzésében, kezelésében. A nem frakcionált heparin (pl. Heparibene) mukopoliszacharid-polikénsav-észter, glükózamin-N-kénsavból és glükuronsav-kénsav-észterekből áll, amelyek egymással glikozidikus úton kapcsolódnak (polimer). Erős negatív töltése miatt bizonyos proteinekkel komplexet alkot (pl. AT). A kis molekulású heparinok (LMWH) csoportba tartozik az enoxaparin (Clexane), mely alacsony, hozzávetőlegesen 4500 dalton molekulatömegű heparin. A készítmény hatóanyaga egy nátriumsó, amely erős anti-FXa aktivitással és gyenge anti-FIIa aktivitással rendelkezik. A heparin hatás legkisebb egysége a fondaparinux-nátrium (pl. Arixtra), amely egy szintetikus pentaszacharid. Az aktivált FX-nek a szelektív inhibitora, ez a hatás AT által mediált. Nem inaktíválja a thrombint. (Forrás: Heparibene, Clexane, fondaparinux gyógyszerek alkalmazási előírásai).

Az AT fehérjének antikoaguláns funkciója mellett számos más funkciója is ismert az emberi szervezetben [23] (2. ábra). Az AT az endothel sejtek felszínén levő specifikus heparán szulfát proteoglikán receptorokhoz (szindekán 4) tud kötődni a D-helixen keresztül, a terápiás célból adott heparin kötéshez hasonlóan [24]. Ez a szignalizációs aktivitása az AT-nak

prosztaciklin szintézist indukál az endothel sejtekben, ezzel gátolva a nukleáris faktor – kappaB útvonalat illetve proinflammatorikus citokinek és adhéziós fehérjék szintézisét [25]. Az AT erős anti-angiogenetikus aktivitással is rendelkezik, azonban ez csak a hasított és/vagy látens konformációjára (az RCL a β redők közé kerül be) jellemző. Mind a hasított és a látens forma is nagyon kicsi heparin affinitással rendelkezik. Ezek az alacsony affinitású AT formák nem mutatnak anti-inflammatorikus funkciókat sem, de erős proapoptotikus szignalizációs aktivitással rendelkeznek az endothel sejteken. Leírták, hogy mind az anti-inflammatorikus és anti-angiogenetikus/proapoptotikus tulajdonsága az AT-nak a D-hélixen keresztüli kölcsönhatással valósul meg [26], [27], [28], [29]. Az AT antibakteriális hatásának egy tanulmány azt tulajdonította, hogy a β -AT kötődik a Gram negatív baktériumokhoz, beleértve az E. colit is és a baktériumok tisztított sejtfal komponenséhez is. A β -AT kötődése a baktérium sejtfalához növelheti a makrofágok fagocita aktivitását és ezáltal a baktérium eliminálódását a szervezetből. Ezt a hipotézist a következő kísérlettel támasztották alá a közlemény szerzői: β -AT-t overexpresszáló egerek vérére E. coli-val inkubálva a baktériumok lízisét figyelték meg és ennek következtében alacsony baktérium számot mértek. [30]. Az antibakteriális hatásonál is a D-hélix szerepét feltételezik.

Az AT anti-inflammatorikus szignalizációs funkcióját endothel sejtekben vizsgálták és kimutatták a D hélix függő kölcsönhatás szükségességét a szindekán 4 receptorral. Többen bizonyították a jelenséget, például egy kísérletben a szindekán receptor kiütését érték el siRNS technikával, és megfigyelték az AT szignalizációs funkciójának a gátlását. Monocitákon is vizsgálták a szignalizációt és kimutatták, hogy esetükben a szindekán 4 receptor specifikus a β -AT-ra [24], [25],[31], [32], [33].

Mindezek alátámasztják az AT nélkülözhetetlen szerepét a szervezetben, mely nemcsak az antithromboticus hatásán keresztül, hanem anti-inflammatorikus, valamint anti-angiogenetikus/proapoptotikus hatásain keresztül is megvalósul.



2. ábra: Az antithrombin fehérje funkciói

Az AT fehérje elsődleges antikoaguláns funkciója mellett anti-inflammatórikus, anti-angiogenetikus és antibakteriális funkciókkal is rendelkezik [23]. P: foszforiláció, NF-kB: nukleáris faktor-kappa B, PGI₂: prosztaciklin, GAG: glükóz-amino-glikánok. (Az AT monomer ábra forrása:

https://en.wikipedia.org/wiki/Antithrombin#/media/File:Antithrombin_monomer.jpeg, a véralvadási kaszkád forrása:

https://hu.wikipedia.org/wiki/V%C3%A9ralvad%C3%A1s#/media/F%C3%A1jl:Coagulation_full.svg), az ábra egyéb elemei saját szerkesztések.

2.3 Az antithrombin deficiencia

Az antithrombin deficiencia (ATD) lehet szerzett vagy öröklött. A szerzett formáról csak röviden pár okot megemlítve: kialakulhat májelégtelenség miatti csökkent AT szintézis következtében, nephrosis szindrómában a megnövekedett AT veszteség miatt, szepszisben vagy akut disszeminált intravasculáris koagulációban a fokozott AT felhasználás és inaktiváció miatt. Leírtak gyógyszer indukálta eseteket is. Például Például L-aszparagináz terápia, hosszú távú, nagy dózisu heparin terápia [4], [1].

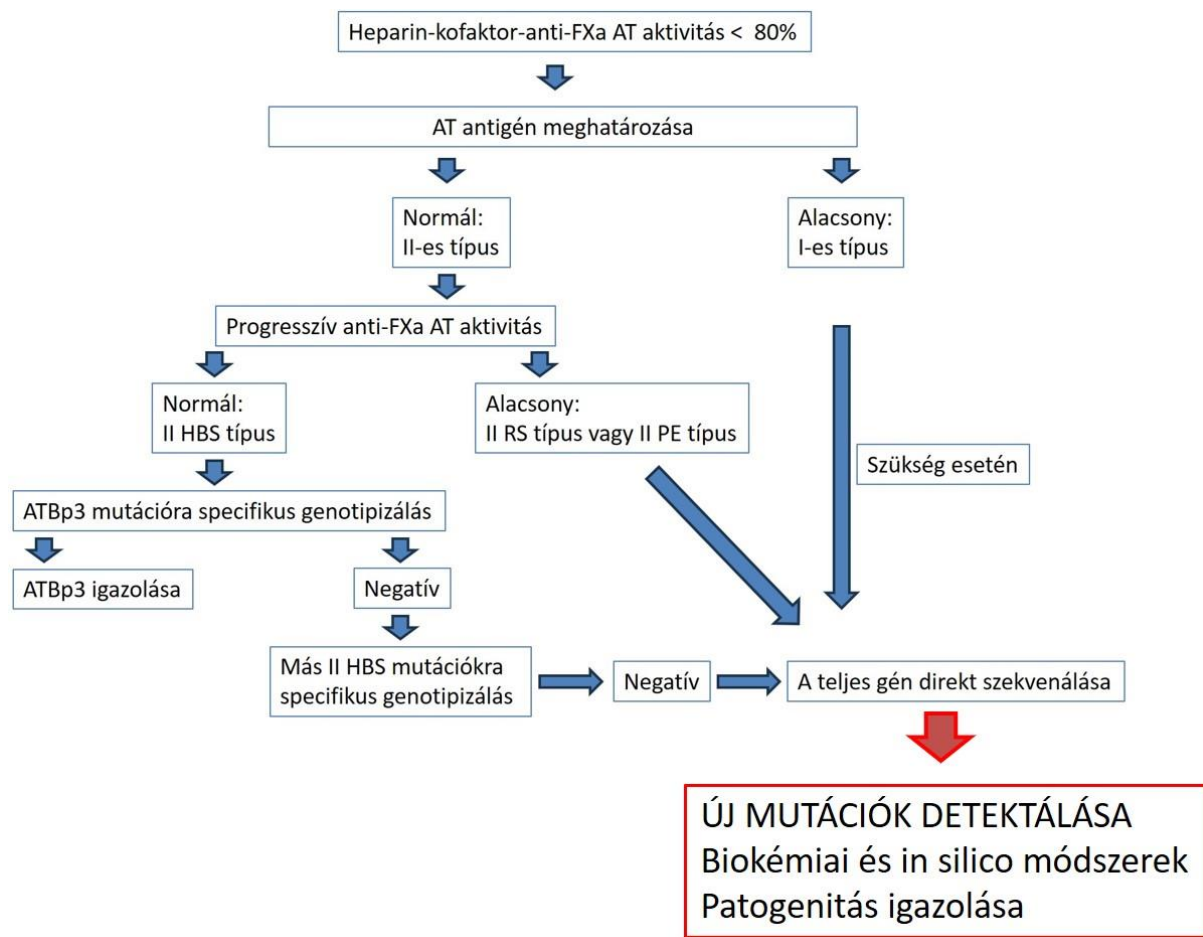
Az öröklött ATD-t két csoportra oszthatjuk fel, az I-es típusú (kvantitatív) és a II-es típusú (kvalitatív) csoportra. Többnyire autoszomális domináns módon öröklődik, férfiakat és nőket egyaránt érint. Az öröklött ATD általában heterozigóta formában fordul elő, mivel a homozigóta esetek kevés kivételtől eltekintve intrauterin halálos kimenetelűek. A kvantitatív defektusra jellemző, hogy az AT antigén szint és az aktivitás arányosan csökkent (1. táblázat). A II-es típust tovább bonthatjuk 3 alcsoportra a defektus elhelyezkedése szerint, úgymint a reaktív helyet érintő (IIRS), a heparin kötő helyet érintő (IIHBS) vagy pleiotróp hatású (IIPE). A kvalitatív defektusra általában referencia tartományon belüli AT antigén szint mellett az AT molekula aktivitásának csökkenése látható, melyet a defektív AT fehérje okoz. A kevésbé súlyos IIHBS altípusban homozigóta betegek is előfordulhatnak [4], [34]. Az ATD prevalenciáját körülbelül 1:2000-re becsülik. Azonban ez a szám nagyobb a thrombosisos betegek között, esetükben feltehetően 1:20 és 1:200 között van, de pontos adataink erre vonatkozóan nem lehetnek, elsősorban populációs sajátosságok, módszertani különbségek és a betegség ritka volta miatt. [35], [36]. Két tanulmány is vizsgálta vénás thromboembolián átesett betegek ATD gyakoriságát, melyet 0,5% - 1,1%-nak adott meg [37], [38]. Egy másik tanulmány 1705 VTE-t elszenvedett beteg adatait vizsgálta és az ATD gyakoriságát 2,4 %-nak határozta meg [39]. A thrombosis a gyermekeknél ritka, előfordulása 0,07 – 0,14/10 000 gyermek évente [40]. Egy meta-analízis és egy japán vizsgálat megállapítása alapján, a gyermekkorban elszenvedett első VTE háttérében nagyon valószínű az öröklött thrombophilia (ATD, protein C, S deficiencia) [41], [42]. Öröklött AT deficiens egyének ismertén megnövekedett kockázattal rendelkeznek a thromboemboliás eseményekre, elsősorban vénás, de akár artériás thrombosisokra is [43], [44], [45], [46], [47], [48], [49], [50]. Ma már ismert (részben saját kutatócsoportunk korábbi eredményeiből [51]), hogy az ATD alcsoportok nem szükségszerűen mutatnak azonos klinikai fenotípust. Továbbá, még az

azonos alcsoporton belül is lehetnek fenotípusbeli különbségek, amelyek egyes mutációkra jellemzőek. Egy japán tanulmány szerint az I-es típus sokkal gyakoribb és sokkal súlyosabb volt, mint a II-es típusú ATD [52]. Az I-es típusú ATD-ben a funkcióvesztéses (loss-of-function) mutációk következménye járt sokkal súlyosabb tünetekkel (fiatalabb életkorban bekövetkező vagy ismétlődő VTE), összehasonlítva más mutáció típusokkal [53], [54]. A legnagyobb számú beteget bevonó francia tanulmányban a vénás thromboembolia (VTE) kockázata alacsonyabb volt a IIHBS típusban az I-es típushoz hasonlítva [55]. A IIHBS típusú ATD gyakrabban hozható összefüggésbe artériás thromboemboliával (ATE) mint az I-es típus és más II-es típusú deficienciák [53]. Egy Dániából származó kisebb esetszámú tanulmány megfigyelése szerint az I-es típusú és a IIRS típusok sokkal súlyosabbak voltak (gyakrabban okoztak VTE-t), mint a IIHBS Basel [56]. Érdekes módon a IIHBS AT deficienciák között a klinikai tünetek szignifikáns heterogenitást mutatnak, ezt 246 AT deficiens beteg bevonásával készült klinikai tanulmányunkban meg is figyelhettük, ugyanis a betegek 75%-a IIHBS típusú beteg volt változatos klinikai fenotípussal [52]. Egy Finnországból származó tanulmányban, ahol az AT Basel (p.Pro73Leu) prevalenciája viszonylag magas, ez a típus magasabb thrombosis kockázattal járt, sőt az ATE és a terhességi komplikációk szintén gyakoriak voltak [57]. Egy másik tanulmány 82 IIHBS ATD beteget vizsgált 6 különböző mutációval, köztük AT Basel és AT Padua (p.Arg79His) mutációval. Megállapították, hogy a vizsgálati csoportjukban a VTE gyakori volt, és ATE is gyakrabban kapcsolódott az AT Basel és a Padua mutációkhoz, az I-es típushoz hasonlítva [58]. Mivel az AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) alapító mutáció Magyarországon, adott volt a lehetőség nagy számú, ilyen beteg vizsgálatára és klinikai fenotípusuk összehasonlítására más IIHBS típusokkal [59]. Míg az AT Budapest 3 (ATBp3) homozigótáság képviseli kiemelkedően a legsúlyosabb thrombophiliát (I-es típusnál is súlyosabb) és VTE-vel is társul, az AT Basel inkább ATE-vel társul és az AT Padua több terhességi komplikációt mutat. Válogatott ATE betegeknél az ATBp3 heterozigóta állapot került leírásra [60]. Figyelembe kell vennünk azonban azt, hogy az azonos öröklött ATD esetén az ahhoz társuló, thrombosisra hajlamosító szerzett rizikótényezők előfordulási gyakorisága jelentősen eltérhet a különböző vizsgálati populációk esetén.

Típusok	Altípusok	heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás	progresszív anti-FXa AT aktivitás	AT antigén	Prevalencia az általános poulációban	Prevalencia a thrombotikus betegek körében	A vénás thromboembolia prevalenciája a különböző altípushoz tartozó betegek esetében
I-es típus (kvantitatív)		alacsony	alacsony	alacsony	az összes ATD 12 %-a	az összes ATD 60 %-a	53 %
II-es típus (kvalitatív)					az összes ATD 88 %-a	az összes ATD 40 %-a	6 – 66 %
	RS	alacsony	alacsony	normál			58 %
	HBS	alacsony	normál	normál			6 %
	PE	alacsony	alacsony	normál			66 %
			vagy normál	vagy alacsony			

1. táblázat: Az antithrombin deficiencia típusai.

A táblázat a [1] és a [4] cikkek alapján készült. RS: reaktív hely, HBS: heparin kötőhely, PE: pleiotróp hatás



3. ábra: Az antithrombin deficiencia laboratóriumi diagnosztikájának algoritmusá

Az ábra a munkacsoportunk „Deficiencies of the natural anticoagulants-novel clinical laboratory aspects of thrombophilia testing” cikke [61] alapján készült.

Az ATD laboratóriumi diagnosztikája egy funkcionális teszten alapszik, ahol az AT aktív faktor X-re (FXa) vagy thrombinra (FIIa) kifejtett gátló hatását mérjük heparin jelenlétében [1]. Megfigyelték, hogy a jelenleg elérhető funkcionális tesztek bizonyos ATD alcsoportokat különböző érzékenységgel mutatják ki, ami megnehezíti a laboratóriumi diagnózist. Az Egyesült Királyság AT deficiens populációjában viszonylag gyakori az AT Cambridge II (p.Ala416Ser) IIRS típusú mutáció, amelyről kimutatták, hogy esetükben a FXa alapú tesztek nem eléggé szenzitívek [62], [63]. Ezzel ellentétben általánosságban elmondható, hogy a FXa alapú tesztek heparin jelenlétében (hc-anti-FXa) sokkal érzékenyebbek a IIHBS ATD-re összehasonlítva a FIIa alapú tesztekkel [64]. A tesztet heparin nélkül végrehajtva a progresszív AT aktivitás (p-anti-FXa) eredményét kapjuk. A progresszív AT aktivitás a heparin kofaktor AT aktivitás arányában határozottan fokozott IIHBS ATD-ben [65]. Kimutatták, hogy a IIHBS betegek körében a hc-anti-FXa AT aktivitás a specifikus mutáció

függvényében változik [51]. Mivel a különböző, kereskedelemben elérhető tesztek különböző szenzitivitással detektálták az ATBp3 homozigóta, ATBp3 heterozigóta, AT Basel és AT Padua heterozigóta mutánsokat, feltételezhető, hogy nem csak az enzim (FIIa vagy FXa), de még más reakció körülmény, például a heparin koncentráció vagy az ionerősség volt felelős a heterogén eredményekért [57], [58], [51], [61]. A magas heparin koncentrációjú tesztek alacsonyabb érzékenységet mutattak az AT Basel és AT Padua esetekben, mint ATBp3 esetén rámutatva ezáltal az AT-heparin kötés erősségében és az AT aktivációban lévő különbségekre ezen mutánsok között.

Az ATD laboratóriumi diagnosztikája során, ha csökkent heparin kofaktor AT aktivitást kapunk (hc-anti-FXa), következő lépésként AT antigén meghatározást végzünk, amely alapján I-es vagy II-es típusba sorolhatjuk a beteget (3. ábra). Normál AT antigén szint II-es típusra utal és ilyenkor elvégzésre kerül a progresszív AT aktivitás. Alacsony progresszív AT aktivitás a IIRS és IPE típusra jellemző, míg a normál progresszív aktivitás IIHBS mutáció jelenlétét veti fel. IIHBS gyanú esetén laboratóriumunkban először az ATBp3 mutáció kimutatása történik meg egy ATBp3-ra kidolgozott specifikus genotipizálási módszerrel (ez azért van így, mert hazánkban az ATBp3 az alapító hatás miatt kiemelkedően gyakori). Ha ez negatívnak bizonyul, akkor még néhány gyakori IIHBS mutációra specifikus genotipizálás történik. Ha ezek sem fedik fel az okozati mutációt, akkor történik meg a teljes *SERPINC1* gén szekvenálása. Új mutáció detektálása esetén megtörténhet azok biokémiai és *in silico* vizsgálata, patogenitásuk megállapítása. A mutáció mutagenizáló primerekkel történő létrehozása után lehetőségünk van HEK-293 sejtek tranziens és stabil transzfekciójára és a mutáns AT fehérje expressziójára. A sejtek stabil transzfekciója optimális nagyobb mennyiségű rekombináns fehérje termeltetésére, melyet tisztítás után a funkcionális vizsgálatokban felhasználunk.

Az új mutációk patogenitása csak direkt és indirekt bizonyítékok alapján állapítható meg, a mutáció besorolásában guideline-ok segítenek [66].

Az új mutációkat – a különböző genetikai/genomikai ajánlások alapján - a következő csoportokba sorolhatjuk be: benignus, valószínűleg benignus, ismeretlen jelentőségű variáns, valószínűleg patogén és patogén. Egy mutációnak a beteg fenotípusára gyakorolt hatása sokféle lehet. Az adott mutáció lehet jóindulatú vagy patogén. Egy adott mutáció patogenitása mellett szólhatnak erős bizonyítékok (pl. a mutáció következménye null variáns) vagy kevésbé erősek (pl. a fehérje hosszúságát megváltoztató mutáció). 2. táblázat.

	Jóindulatú		Patogén			
	Erős	Támogató	Támogató	Közepes	Erős	Nagyon erős
Populációs adatok	Túl magas MAF (BA1/BS1), vagy a mutáció kontroll csoportban is előfordul és az nem felel meg a betegség penetranciájának (BS2)			Hiányzik a populációs adatbázisokból (PM2)	A mutáció statisztikailag szignifikánsan magasabb arányban fordul elő a betegekben a kontrollokhoz képest (PS4)	
Számítógépes és predikciós adatok		Többféle számítógépes bizonyíték mutatja, hogy a mutációnak nincs hatása a génre/géntermékre (BP4) Misszensz mutáció olyan génben, ahol csak a csonkító (truncating) mutáció okoz betegséget (BP1) Csendes variáns, melynek valószínűleg nincs	Többféle számítógépes bizonyíték támasztja alá a mutáció ártalmatlan hatását a génre/géntermékre (PP3)	Új misszensz mutáció egy olyan pozícióban, ahol már korábban leírtak egy másik patogén misszensz változást (PM5) A fehérje hosszúságát megváltoztató mutáció (PM4)	Az új mutáció következtében ugyanolyan aminosav csere történik, mint egy már elfogadott patogén variáns esetében (PS1)	A mutáció következménye null variáns egy olyan génben, ahol a LOF ismert mechanizmusa a betegségnek (PVS1)

		hatása a splicingra (BP7)				
Funkcionális adatok	Helyesen kivitelezett funkcionális vizsgálatok bizonyítják, hogy a mutáció nem káros hatású (BS3)		Misszensz mutáció olyan génben, ahol alacsony a jóindulatú misszensz variánsok aránya és a patogén misszenszeké gyakori (PP2)	A mutáció az adott gén mutációs forró pontján vagy jól ismert funkcionális doménjén található, ahol jóindulatú variánsok nem fordulnak elő (PM1)	Általánosan elfogadott funkcionális vizsgálatok által kimutatott káros hatás PS3	
Szegregációs adatok	Nincs szegregáció a betegséggel (BS4)		Együttes szegregáció a betegséggel több érintett családtagban (PP1)	Erősebb szegregációs adatok →	Erősebb szegregációs adatok →	Erősebb szegregációs adatok →
De novo adatok				De novo (apai és anyai megerősítés nélkül) (PM6)	De novo (apai és anyai megerősítéssel) (PS2)	
Allélikus adatok		Egy domináns variánssal transz helyzetben megfigyelt mutáció (BP2) Patogén variánssal cisz helyzetben		Recesszív betegség esetében patogén variánssal transz helyzetben lévő mutáció (PM3)		

		megfigyelt mutáció (BP2)				
Egyéb adatbázisok		Megbízható forrás megosztott adattal vagy nélküle = jóindulatú (BP6)	Megbízható forrás = patogén (PP5)			
Egyéb adatok		A mutáció olyan esetben található meg, ahol a betegség jól magyarázható egy másik okkal (BP5)	A beteg fenotípusa vagy a FH nagymértékben specifikus a génre (PP4)			

2. Táblázat: A mutációk patogenitására vonatkozó bizonyítékok rendszere

A táblázatban rendszerezve vannak az egyes jellegzetességek a bizonyíték típusa szerint és a jellegzetesség erőssége szerint, mind jóindulatú (bal oldal), mind patogén (jobb oldal) esetet meghatározva. Rövidítések: BA1 (stand-alone evidence of benign) a bizonyíték önmagában is megállja a helyét jóindulatú variánsok esetében, BS1-4 (benign strong) jóindulatú erős, BP1-7 (benign supporting) jóindulatú támogató, FH (family history) családi anamnézis, LOF (loss-of-function) funkcióvesztéssel járó mutáció, MAF (minor allele frequency) minor allél gyakoriság, PM1-6 (pathogenic moderate) patogén közepes, PP1-5 (pathogenic supporting) patogén támogató, PS1-4 (pathogenic strong) patogén erős, PVS1 (pathogenic very strong) patogén nagyon erős [66].

3. Célkitűzés

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált ATD betegeknél gyakran előforduló három, ismert, kifejezetten az AT heparin-kötő helyet érintő mutáció (ATBp3, AT Basel és AT Padua) összehasonlító biokémiai és *in silico* vizsgálatát terveztük, részletesen a heparin kötés mechanizmusát jellemezve.

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált ATD betegeknél talált kilenc új *SERPINC1* mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr és p.Pro461Thr) biokémiai és *in silico* karakterizálását terveztük. Ezáltal patogenitásuk igazolását tűztük ki célul.

4. Betegek és Módszerek

4.1 Antithrombin deficiens betegek klinikai és rutin laboratóriumi jellemzése

A DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken 2007 január és 2021 december között ATD-val diagnosztizált betegek (n=478) mutációit vizsgáltuk. A betegektől származó vért 3,2% Na-citrát tartalmú vacutainer vérvételi csőbe (Beckton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) gyűjtötték. Centrifugálás után a plazma mintákat -80 °C-on tároltuk a felhasználásig. Az öröklött trombofília (protein C és S deficiencia, APC rezisztencia, FII20210A allél, diszfibrinogénia) vizsgálatai rutin hemosztázis laboratóriumi módszerekkel történtek BCS-XP koagulométeren (Siemens, Marburg, Germany), illetve a FV Leiden mutáció és a FII20210A allél esetében rutin genetikai módszerekkel LightCycler 480 készülékben (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Az ATD diagnosztizálására heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitást és progresszív anti-FXa AT aktivitást (Labexpert Antithrombin H + P, Labexpert Ltd., Debrecen, Hungary) mértünk BCS-XP koagulométeren. Az AT antigén immunonefelometriás módszerrel lett meghatározva BN-Prospec nefelométerben (Siemens, N Antiserum to Human Antithrombin III). A klinikai adatok retrospektív módon lettek összegyűjtve a betegektől. Az első thromboticus esemény ideje és típusa az orvosi dokumentációból ismert. Etikai engedély: 3166/2012/HER.

4.2 Antithrombin deficiens betegek *SERPINC1* génmutáció analízise

A genomi DNS-t perifériás vérmintából izoláltuk a QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) segítségével. A *SERPINC1* gén kódoló régiója, az exon-intron határok és a promoter régió Sanger szekvenálása ABI3130 készüléken Sequencing Analysis 5.4 szoftverrel (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) történt. Ha a Sanger szekvenálás nem talált okozati mutációt, akkor multiplex ligáció függő próba amplifikáció (MLPA) vizsgálatot végeztünk SALSA MLPA KIT P227 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) felhasználásával. Az MLPA termékeket GeneMapper szoftver 4.1 verziójával elemeztük (Thermo Fisher Scientific).

4.3 Keresztezett Immuno elektroforézis (Crossed Immuno electrophoresis CIE)

A keresztezett immuno elektroforézis (crossed immuno electrophoresis CIE) Sas és munkatársai cikke alapján volt kivitelezve [67]. Az első elektroforézis 16,3 U/ml frakcionálatlan nátrium heparin tartalmú 1%-os agaróz gélen 150 V-on 60 percig futott. Az elektroforézis második dimenziója 1% nyúl anti-humán AT antiszérumot (Sigma, Saint Louis, MO, USA) tartalmazó 1%-os agaróz gélen futott 100 V-on 180 percig. A kísérletet az ATBp3 heterozigóta és homozigóta, AT Basel és AT Padua betegek Na-citráttal antikoagulált plazma mintáin végeztük el. Kontrollként egészséges személyekből nyert poolozott plazma szolgált.

4.4 Nano DSF

A fehérje feltekeredés és stabilitás pontos mérésére a Nano DSF (Differential Scanning Fluorimetry) módszert alkalmaztuk. A NanoDSF mérés a belső triptofán vagy tirozin fluoreszenciájának mérésén alapszik. A fehérjék letekeredése (unfolding) közben a fehérjét alkotó triptofán hidratált lesz és a fluoreszencia intenzitásának maximuma eltolódik 330 nm-ről 350 nm-re. A fehérjék hőstabilitása leírható a thermal unfolding transition midpoint (T_m) értékkel, melynél a fehérje populáció fele letekeredett (unfolded) állapotú. A hőstabilitást jellemezhetjük még a denaturáció kezdeti hőmérsékletével ($T_{kezdeti}$). A T_m meghatározása a denaturációs görbe meredekségének kezdeti pontjából, ami a 330 és 350 nm-en mért triptofán fluoreszencia a hőmérséklet függvényében ábrázolva vagy az első deriváltjának maximuma. A Prometheus NT.48 (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) kettős hullámhosszú rendszere lehetővé tette az AT fehérje vad típusú és ATBp3 mutáns formáinak hő hatására lejátszódó letekeredési (unfolding) folyamatának vizsgálatát. A minták 8 μ M koncentrációban triplikátumban voltak indítva standard üveg kapillárisokban. A minta térfogata 10 μ l volt kapillárisonként. Az analízis során a mintákat felmelegítettük 20 °C-ról 95 °C-ra fokozatosan percenként 1 °C-ot emelve a hőmérsékleten. A T_m és a $T_{kezdeti}$ értékek a PR.ThermControl szoftver 2.1.2 verziójával (NanoTemper Technologies GmbH, Munich, Germany) lettek kiszámítva a hőmérséklet függvényében ábrázolt 350 nm/330 nm fluoreszencia arányok első deriváltja alapján. A T_m értékeket 3 független kísérletből

határoztuk meg. A kísérletet egészséges (azaz nem ATD személyek) és ATBp3 homozigóta betegek Na-citráttal antikoagulált plazma mintáiból végeztük el.

4.5 A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék in vitro expressziója

A vad típusú plazmidot (ORF-NM_000488_pcDNA3.1(+)) vad típusú AT) az ImaGenes GmbH (Berlin, Germany) cégtől rendeltük meg. A 12 mutáns plazmidot (p.Leu131Phe, p.Pro73Leu, p.Arg79His, p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) a Stratagene Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) segítségével hoztuk létre. Mutagenizáló primerek (BioScience, Integrated DNA Technologies, BVBA, München, Germany):

p.Leu131Phe (ATBp3) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GCCTGTAATGACACCTTCCAGCAACTGATG – 3'

primer 2: 5' – CATCAGTTGCTGGAAGGTGTCATTACAGGC – 3'

p.Pro73Leu (AT Basel) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGCTCAGAACAGAAGATCCTGGAGGCCACCAAC – 3'

primer 2: 5' – GTTGGTGGCCTCCAGGATCTTCTGTTCTGAGCC – 3'

p.Arg79His (AT Padua) mutáció esetében:

primer 1: 5' – GCCACCAACCGGCATGTCTGGGAACTGTC – 3'

primer 2: 5' – GACAGTCCCAGACATGCCGGTTGGTGGC – 3'

p.Arg14Lys mutáció esetében:

primer 1: 5' – TAACCTCTGGAAAAAGAAGGTTTATCTTTTGTCT – 3'

primer 2: 5' – AGGACAAAAGATAAACCTTCTTTTTTCCAGAGGTTA – 3'

p.Cys32Tyr mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGACTGCGTGACCTATCACGGGAGCCCTGTGGAC – 3'

primer 2: 5' – GTCCACAGGGCTCCCGTGATAGGTCACGCAGTCC – 3'

p.Arg78Gly mutáció esetében:

primer 1: 5' – AGGCCACCAACGGGCGTGTCTGGGAACTG – 3'

primer 2: 5' – CAGTCCCAGACACGCCCGTTGGTGGCCT – 3'

p.Met121Arg mutáció esetében:

primer 1: 5' – CGGCTTTTGCTAGGACCAAGCTGGGTGCC – 3'

primer 2: 5' – GGCACCCAGCTTGGTCCTAGCAAAAAGCCG – 3'

p.Leu245Pro mutáció esetében:

primer 1: 5' – CAATGAGCTCACTGTTCCGGTGCTGGTTAACACC – 3'

primer 2: 5' – GGTGTTAACCAGCACCGGAACAGTGAGCTCATTG – 3'

p.Leu270Argfs*14 mutáció esetében:

primer 1: 5' – CACAAGGAAGGAACGTTCTACAAGGCTGAT – 3'

primer 2: 5' – ATCAGCCTTGTAGAACGTTTCCTTCCTTGTG – 3'

p.Asn450Ile mutáció esetében:

primer 1: 5' – GAGAAGTTCCTCTGATCACTATTATCTTCATGGGC – 3'

primer 2: 5' – GCCCATGAAGATAATAGTGATCAGAGGAACTTCTC – 3'

p.Gly456delins_Ala_Thr mutáció esetében:

primer 1: 5' - CTATTATCTTCATGGCTACAAGAGTAGCCAACCC – 3'

primer 2: 5' - GGGTTGGCTACTCTTGTAGCCATGAAGATAATAG – 3'

p.Pro461Thr mutáció esetében:

primer 1: 5' – GGCAGAGTAGCCAACCCTTGTGTTAAGTAA – 3'

primer 2: 5' – TTACTIONAACACAAGGGTTGGCTACTCTGCCC – 3'

A mutagenizáló PCR reakciók összetétele minden esetben 25 µl végtérfogatban a következők szerint történt: 10x koncentrációjú PCR puffer, 50 ng dsDNS vektor a vad típusú AT inzerttel, 125 ng primer 1, 125 ng primer 2, dNTP mix, steril desztillált víz és 2,5 U/µl PfuTurbo DNS polimeráz. A mutagenizáló PCR reakció protokollja: denaturálás 95°C-on fél percig, amit 16 ciklus követ az alábbiak szerint 95°C fél perc, 55°C 1 perc, 68°C 7 perc. Utolsó lépésként 10 U/µl DpnI restriktív enzimmel a mutációt nem tartalmazó templát szál emésztése történik meg. A transzformáláshoz OneShot® TOP10 kompetens E. coli sejteket használtunk, a plazmidok izolálása QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításai szerint. A helyspecifikus mutagenézis sikerességét szekvenálással ellenőriztük. A human embryonic kidney (HEK-293) sejtek 10% FBS-el (Gibco), 2 mM L-glutaminnal és 25 µg/ml antibiotikummal (gentamicin, Chinoin, Budapest, Hungary) kiegészített Dulbecco's Modified Eagle's médiumban (DMEM, High glucose, Biosera) 37 °C-on, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban T25-ös flaskában nőttek. A kísérletekben felhasznált sejtek 60-80% konfluencia elérése esetén 2 naponta voltak passzálva standard tripszines módszer szerint maximum 20 alkalommal. A vad típusú és a kilenc mutáns AT plazmid tranziens transzfekciója a gyártó útmutatása szerint X-tremeGENE HP DNA transzfekciós reagenssel (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) és a LacZ gén kotranszfekciója pCMV Sport β-GAL plasmiddal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) történt. 48 órás inkubáció

után a sejtfelülűszót összegyűjtöttük, a sejteket lízis puffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0,5% nátrium-dezoxikolat és proteáz inhibitor tableta, Roche Diagnostics GmbH) hozzáadásával lizáltuk. A mintákat centrifugálás után eppendorf csövekbe mértük, aliquotokra osztva -80 °C-on tároltuk felhasználásig. A transzfekció hatékonyságának vizsgálatára a FluoReporterlacZ/Galactosidase Quantitation Kitet (Molecular Probes, Life Technologies) alkalmaztuk és az eredményeinket ennek megfelelően korigáltuk.

4.6 A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék stabil transzfekciója

Stabil transzfekció esetén a bejuttatott plazmidban található rezisztencia génre a megfelelő antibiotikum jelenlétében kell szelektálni több héten/hónapon keresztül. A transzgén integrálódik a genomban.

Az eljárás első lépéseként a szelekciós antibiotikum optimális koncentrációját határoztuk meg. Szelekciós antibiotikumnak a Geneticin® Selective Antibiotic-ot (Gibco, ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) használtuk. A megfelelő koncentrációt dózis-hatás vizsgálattal választottuk ki, melynek során a human embryonic kidney (HEK-293) sejteket geneticinnel kezeltünk növekvő (0-1000 µg/ml) koncentrációban. A vizsgálat során azt a minimális koncentrációt kerestük meg, amely 10 nap alatt az összes sejtet elpusztította. Ez a koncentráció 400 µg/ml-nek adódott. A geneticin rezisztenciát a pcDNA3.1(+) konstrukció neomycin rezisztencia génje biztosította. A második lépés a megfelelő számú HEK-293 sejt transzfekciója. A következő plazmidokat a Lipofectamine®3000 Transfection Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) segítségével jutattuk be a sejtekbe: huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _WT, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _ATBp3, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _AT Basel, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _AT Padua, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Arg14Lys, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Cys32Tyr, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Arg78Gly, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Met121Arg, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Leu245Pro, huSERPINC1_pcDNA3.1(+) _p.Pro461Thr. A vad és a mutáns plazmidok koncentrációját Nanodrop 2000 spektrofotométerrel határoztuk meg, az eredmények alapján állítottuk össze a transzfekciós elegyet a reagenshez mellékelt protokoll szerint.

A harmadik lépés a sikeresen transzfektált sejtek szelekciója. A sejteket 400 µg/ml geneticin tartalmú szelekciós médiumban tenyésztve több hét elteltével csak a plazmidot felvett sejtek

fognak túlélni. A túlélő sejteket 200 µg/ml geneticin tartalmú médiummal tenyésztettük tovább.

A sejtek egy részét poliklonális sejtvonalként fagyasztottuk, majd folyékony nitrogénbe helyeztük hosszú-távú tárolás céljából. A sejtek másik részét tovább tenyésztettük további kísérletekhez.

4.7 In vitro expresszált rekombináns antithrombin fehérjék és plazmából származó (normál és ATBp3 homozigóta) antithrombin tisztítása affinitás kromatográfiával

Az öt mutáns (ATBp3, AT Basel, AT Padua, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) és a vad típus esetében a sejteket passzáltuk, míg 12-12 db T75-ös flaska állt rendelkezésünkre. A felülúszó begyűjtése előtt 24 órával a tápfolyadékot FBS-mentes tápfolyadéokra cseréltük (13 ml/T75-ös flaska). Mintánként 156 ml felülúszó volt, amit Amicon® Ultra-30K (Merck Millipore, Burlington, VT, USA) oszlop segítségével bekoncentráltunk. A koncentráció után 25-30 ml minta állt rendelkezésünkre, melyet affinitás kromatográfiás módszerrel tisztítottunk. Sepharose 4B gél oszlopon kovalensen kötött kecske anti-humán antithrombin IgG (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada) felhasználásával történt a tisztítás. A plazmából származó normál és ATBp3 homozigóta AT minták tisztítása is a fenti protokoll szerint történt.

4.8 Felületi Plazmon Rezonancia (SPR-Surface Plasmon Resonance)

A felületi plazmon rezonancia vizsgálatok Biacore 3000 készüléken történtek (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). A különböző AT mutánsok heparin kötő képességét heparin SPR szenzor chip (Heparin Approx. 50 nm hidrogél chip, Xantec bioanalytics GmbH, Dusseldorf, Germany) segítségével mértük. A vad típusú és a mutáns AT fehérjék futtató pufferben (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3mM, felületaktív anyag 0,005% (v/v), pH 8,4) voltak hígítva és különböző koncentrációkban injektáltuk a heparinnal fedett szenzor chip felületére 10 µl/min áramlási sebességgel 7 percen keresztül. Két mérés között a szenzor chip felületét 30 µl regeneráló pufferrel (10 mM glicin-HCl, pH 2,5, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) regeneráltuk. A kölcsönhatás optimális pH értéke előzőleg már meghatározásra került, ennek értelmében a mérést pH 8,4-en végeztük [65]. A Langmuir 1:1 kötési modellt

alkalmaztuk a kötődési görbe illesztésre. Az asszociációs és a disszociációs sebesség állandókat (k_a és k_d) és az asszociációs és disszociációs egyensúlyi állandókat (K_A és K_D) a szenzorgramokból határoztuk meg. BIAevaluation szoftver 3.2-es verzióját (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) használtuk a kölcsönhatás vizsgálat kiértékelésére.

4.9 A rekombináns antithrombin fehérjék AT antigén és aktivitás mérései

A vad típusú és a mutáns AT plazmiddal transzfektált HEK-293 sejtek felülűszójából és sejtlyázátumából került meghatározásra az AT antigén enzimhez kapcsolt immunoszorbens assay (ELISA) módszerrel Abcam Human-Antithrombin-III-ELISA-Kit (Abcam, Cambridge, UK) segítségével a gyártó útmutatását követve. Az AT specifikus kötő antitestet a 96-lyukú lemez alján a gyártó által előkészítve találjuk, a lyukakba a standard sor tagjait és a vizsgálandó mintákat hozzámérjük és inkubáljuk szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. Mosási lépés után hozzáadjuk a biotinált AT specifikus antitestet és 1 órán át inkubáljuk szobahőmérsékleten. Mosási lépést követően hozzáadjuk a Streptavidin-peroxidáz konjugátumot, ami kapcsolódik az előzetesen megkötött antigén-antitest komplexhez. 30 perc várakozás után, mosási lépést követően hozzámérjük a TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidin) kromogén szubsztrátot. 12 perc elteltével kialakul a kék szín, mivel a szubsztrátot a peroxidáz hidrolizálja. A leállító oldat hozzáadása után a kék szín sárgára változik. A sárga szín intenzitása arányos a mintában lévő AT mennyiségével. A színintenzitást Infinite 200 mikrolemez fotométerrel (Tecan Austria GmbH, Salzburg, Ausztria) mértük 450 nm-en, az eredmények értékelése Excel program segítségével a standard sor ismert koncentrációjú tagjaihoz tartozó abszorbancia értékek alapján történt.

A heparin kofaktor és a progresszív AT aktivitás méréseket a transzfektált sejtek felülűszójából végeztük LX Antithrombin Hc + P, FXa reagens (Labexpert Ltd., Debrecen, Hungary) felhasználásával. A heparin kofaktor aktivitás meghatározása során a felülűszó mintákat heparin tartalmú pufferrel hígítjuk, majd feleslegben FXa-t adunk hozzá. A nem kötődött FXa aktivitását egy specifikus kromogén szubsztráttal BIOPHEN CS-11(32) [Suc-Ile-Gly-(γ Pip)Gly-Arg-pNA, HCl] (HYPHEN Biomed., Neuville, France) mérjük. A FXa lehasítja a para-nitro-anilin-t (pNA) a szubsztrátról, amely 405 nm-en mérhető színes termék. Minél több AT van a felülűszóban, annál kevesebb szabad FXa marad a rendszerben és kevesebb színes termék keletkezik. A mérés során 1:1 arányban mértük össze a mintát és a

FXa reagenst 96-lyukú lemezen, duplikátumban. 60 másodpercig inkubáltuk 37 °C-on, majd a kromogén szubsztrát hozzáadása után 405 nm-en 300 másodpercig követtük az abszorbancia változást. Progresszív aktivitás mérésekor a mintákat polibrén tartalmú pufferrel hígítottuk az esetleges heparin szennyeződés és a heparin hatás teljes kizárása céljából. A mérés során 1:1 arányban mértük össze a mintát és a FXa reagenst 96-lyukú lemezen, duplikátumban. 5 percig inkubáltuk 37 °C-on, majd a kromogén szubsztrát hozzáadása után 405 nm-en 300 másodpercig követtük az abszorbancia változást. Ismert AT tartalmú kalibrációs plazma segítségével egy kalibrációs egyenest készítünk, Excel program segítségével a minták abszorbancia értéke alapján számoltuk az antithrombin aktivitást.

4.10 N-glikozidáz F emésztés

Az N-glikozidáz F az aszparagin kötött N-glikánokat hasítja le a glikoproteinekről. Az N-glikánokat a vad típusú és a p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr mutáns antithrombin fehérjék esetében távolítottuk el az N-Glycosidase F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) enzim segítségével. A PNGase F emésztés előtt a mintákat 150 mM Na-foszfáttal denaturáltuk 95 °C-on 5 percig. Ezután adtuk hozzá a 6 µl 100 U/ml PNGase F enzimet és inkubáltuk a mintákat 37 °C-on 15 órán keresztül. Az emésztett mintákat a kontroll párjaikkal együtt Western blot technikával vizualizáltuk.

4.11 Western blot

A transzfektált (tranzien és stabil transzfekció) HEK-293 sejtek felülúszóját összegyűjtöttük, majd a sejteket lizáltuk 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% nátrium-dezoxikolat és proteáz inhibitor koktél (Roche) tartalmú lízis pufferben. A felülúszó és a sejtízátum mintákat centrifugáltuk 4 °C-on 15 percig 12000 g-n, majd aliqvothokba osztottuk a mintákat és – 20 °C-on tároltuk felhasználásig. A minták fehérje koncentrációját Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértük meg és az eredmény alapján egységes mennyiségű fehérjét futtattunk 10%-os SDS-PAGE gélen majd nitrocellulóz membránra blottoltuk át a fehérjéket nedves blot technikával. A membránt 5%-

os zsírszegény tejpor TTBS pufferban (Tween 20-Tris buffered saline) blokkoltuk 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd az elsődleges antitesttel egy éjszakán át hidegszobában inkubáltuk. Az AT detektálása kecske anti-humán AT antitesttel (Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada) történt, a sejtlizátum minták esetében loading kontrollnak beta tubulin poliklonális antitestet (Invitrogen) alkalmaztunk. Az elsődleges antitestek a blokkoló oldatban 1:10000 hígításban voltak. Inkubációt követően a membránokat mostuk háromszor 7 percig TTBS pufferban, majd a megfelelő másodlagos antitesttel inkubáltuk 45 percig szobahőmérsékleten. Torma-peroxidáz kapcsolt anti-kecske IgG (Abcam) és anti-nyúl IgG (GE Healthcare) blokkoló oldatban 1:10000 hígításban voltak alkalmazva. Az immunreakciót ECL technikával váltottuk ki a gyártó utasításait követve (Thermo Fisher Scientific). A kemilumineszcens detektálás C300 Azure készülékkel történt (Azure Biosystems, Dublin, CA, USA).

4.12 RT-qPCR

Real-time quantitative RT-PCR technikát használtunk a vad típusú és a kilenc mutáns AT forma mRNS expressziós szintjének meghatározására tranziens transzfekciót követően. Az RNS izolálás QIAamp RNA Blood Mini Kit (QIAGEN) segítségével történt a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtekből. A genomi DNS eltávolítása RapidOut DNA Removal Kittal (Thermo Scientific) történt, majd a reverz transzkripció (qPCRBIO cDNA Synthesis Kit) után következett a RT-qPCR LightCycler480 (Roche) készüléken a következő primerekkel:

AT RNA forward primer 5' –GCTAAACCCCAACAGGGTGA-3';

AT RNA reverse primer 5' –TACTTAAACACAAGGGTTGGCTAC-3';

OAZ RNA forward primer 5' –CACCATGCCGCTCCTAAG-3';

OAZ RNA reverse primer 5' –GAGGGAGACCCTGGA ACTCT-3';

β-GAL RNA forward primer 5' –GCGTACATCGGGCAAATAAT-3';

β-GAL RNA reverse primer 5' –TAATCACGACGCGCTGTATC-3'.

Előinkubáció 10 perc 95° C 1 ciklus; amplifikáció 10 sec 95° C, 10 sec 51° C, 10 sec 72° C, 50 ciklus; olvadási görbe felvétele 1 perc 95° C, 1 perc 45° C, folyamatos 75° C, 1 ciklus; majd hűtés 30 sec 40° C 1 ciklus.

4.13 In silico módszerek

4.13.1 ATD II heparin-kötőhely (IIHBS) mutációk (ATBp3, AT Basel, AT Padua) vizsgálata in silico módszerekkel

Az in silico módszerekkel nyert eredmények Dr. Balogh Gábor munkái, a módszerek részletes bemutatását mégis szükségesnek érezzük itt, az eredmények interpretációjának könnyebb érthetősége érdekében.

A mutációk AT - heparin (pentaszacharid) kötése gyakorolt hatásának vizsgálatára és a fehérje stabilitásának vizsgálatára kétféle modell rendszert hoztunk létre. Elsőként a 1T1F röntgen-diffrakciós szerkezetet használtuk a pentaszacharidokat nem tartalmazó rendszer modellezéséhez, ezzel a nem aktivált állapotot mutattuk be [68]. Másodjára a pentaszacharidot kötött, aktivált AT-t modelleztük az 1NQ9 röntgen-diffrakciós szerkezetből kiindulva [69]. E modelleket megszerkesztettük mindkét aktivációs státusznak megfelelően a vad típusú AT és mind a három (ATBp3, AT Basel, AT Padua) mutáns esetében. Az utóbbi variánst mind semleges és protonált His79 (His47 az érett fehérjében) formában szimuláltuk. Az összes rendszer szolvatálva volt a TIP3P víz modell CHARMM változatát használva. A szimulációs dobozok kocka alakúak voltak és a minimum távolság a fehérje (vagy a ligand) és a doboz falai között 12 Å volt. Na⁺ és Cl⁻ ionok hozzáadásával az ionerősséget 0,15 M-re állítottuk be, és a munkacsoport korábbi tanulmányához hasonlóan [70] a CHARMM36m erőteret választottuk az AT fehérje, valamint a CHARMM szénhidrát FF erőteret a pentaszacharid esetében [71], [72]. A β-AT szerkezetnek megfelelően, a fehérje glikozilálva volt három aszparagin reziduumon: Asn-96, -155, és a -192 (a számozás itt az érett fehérjének felel meg, a molekulamodellezés követelményei szerint) [73]. A nagy méretük miatt az oligoszacharid láncok csonkítva voltak hasonlóan, mint az előbb említett tanulmányban. A CHARMM-GUI web szerveret használtuk a topológiai file-ok generálására mind a három rendszer esetében [74], [75], [76]. Ennek következtében a megfelelő mintavételezés ilyen konformációs átmeneteknél gyakran megköveteli a „javított” mintavételezési technikákat. A Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GAMD) módszert választottuk ki, mert ez jelentősen kiterjesztett mintavételezést biztosított, és nem függött előre definiált reakció koordinátáktól [77]. Az AMBER 16 pmemd.cuda szoftvert alkalmaztuk a molekula dinamikai (MD) és a GAMD szimulációkhoz [78], (ambermd.org). Az összes modell rendszer először két egymást követő energiaminimálásnak volt alávetve, mindegyik 2000 lépésből állt. Az első energiaminimálás magában foglalt egy 500 lépést,

amely a „steepest descent” módszert használta, és 1500 lépés konjugát gradiens módszert, úgy, hogy a fehérje és a ligand pozíciója korlátozott volt. A következő 2000 lépésben a reziduumok nem voltak korlátozva és a konjugát gradiens módszert alkalmaztuk. A rendszert ezután felfűtöttük 0 K-ról 310K-ig 2 ns MD szimulációban, úgy, hogy az összes nem-oldószer és nem-ion atomok korlátozva voltak. A fűtést 2 ns nyomás kiegyenlítés követt. Kettős gyorsítás (dual boost) sémát alkalmaztunk a GAMD szimulációinkban [77]. A σ_0^P és a σ_0^D paraméterek az alapértelmezett értékekre (6,0) voltak beállítva a GAMD szimulációban. Az összes GAMD szimuláció tartalmazott egy 60 ns-os ekvibrációs fázist a „produkciós” szimuláció előtt. Az első 10 ns-ben, nem alkalmaztunk GAMD potenciált a rendszeren és a 4-10 ns rész alatt gyűjtöttük az adatokat. A következő 50 ns-ben használtuk a GAMD potenciált a rendszeren. A GAMD paraméterek rendszeres időközönként frissítve voltak, kivéve az 50 ns-os fázis első 5 ns szakaszában. A „produkciós” GAMD szimulációk 310 K-n játszódtak le NVT körülmények alatt. A Langevin hőmérséklet szabályozót alkalmaztunk a szimulációban 2,0 gamma konstanssal. A „produkciós” szimulációkban a Monte Carlo nyomás-szabályozót használtuk a nyomás kapcsolására. A nagy hatótávolságú elektrosztatikus kölcsönhatások a PME módszerrel voltak kiszámolva [79]. 12 Å Coulomb „cut-off” távolságot alkalmaztunk a szimulációkban. A CHARMM erőter estében ajánlott az energia kapcsoló használata 10 Å és 12 Å között a Lennard-Jones kölcsönhatások miatt. Az összes „produkciós” szimuláció 600 ns hosszúságú volt. Mindegyik mutáns esetében két párhuzamos szimuláció volt futtatva az 1T1F alapú és három az 1NQ9 alapú rendszerek esetében. Ez megfelel 1,2 μ s és 1,8 μ s kombinált szimulációs időnek mindegyik AT mutánsra. Az összes „produkciós” szimulációs idő 15 μ s volt. A CPPTRA [80] szoftvert használtuk a legtöbb trajektória analíziséhez, amely tartalmazott RMSD és RMSF számításokat, valamint csoportosításokat. Az „általánosított korreláció” számításokat az Ichiye és Karplus korábbi munkája alapján Lange és Grubmüller által kifejlesztett módszer alkalmazásával végeztük el [79], [81].

4.13.2 *SERPINCI* gén misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója

A 7 misszensz mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Pro461Thr) következményének predikciójára 5 különböző, webes felületen elérhető eszközt használtunk. A PolyPhen2 eszköz a humán fehérjékben bekövetkező aminosav cserék következményeit jelzi előre. Több forrásból származó információt vesz tekintetbe, úgymint homológ szekvenciákat, szerkezeti sajátosságokat, és 3D struktúrákat

[82]. A PolyPhen2 két különböző - HumDiv és HumVar - modellt alkalmaz, melyek különböző adatkészleten lettek betanítva. A HumVar jobban megfelel drasztikus, betegséget okozó hatással bíró mutációk detektálására, míg a HumDiv alkalmas sokkal összetettebb fenotípusban megjelenő hatás és enyhébb hatású variánsok jóslására [83]. A MutPred2 gépi tanulási modellt használ, hogy csoportosítsa az emberekben található mutációkat aszerint, hogy patogének vagy jóindulatúak. Mindemellett megjósolja a mutáció hatását a fehérje számos szerkezeti és funkcionális tulajdonságára [84]. A PhD-SNP egy Support Vector Machine (SVM)-alapú csoportosító a misszensz mutációk számára, amely figyelembe veszi a mutációt, a szekvencia környezetét és a szekvencia profilját [85]. A SIFT egy szekvencia homológia alapú módszer, amely különbséget tesz a fehérjékben létrejött aminosav cserék hatásai között, úgy mint potenciálisan fenotípusos következménnyel járó vagy nem járó. Azok a mutációk, melyek 0,05 ponttal megegyezők vagy annál kisebbek, a károsító mutációk csoportját képezik [86]. A MutationTaster program a DNS szekvencia alapján jóslja meg a variánsok és a mutációk következményét. Ebben az esetben a kapott pont a korrekt előrejelzés valószínűségét adja meg és nem egy érték, amely különbséget tesz patogén és nem patogén mutáció között [87]. A PolyPhen2, MutPred2, és a PhD-SNP módszerek esetében, a mutáció patogénnek tekintendő 0,5 pont alatt. A szignál peptidben található két misszensz mutáció (p.Arg14Lys és p.Cys32Tyr) esetében a SignalP 6.0 (csak eukarióta szignál peptid) program segítségével a szignál peptid hasításának predikcióját végeztük el.

5. Eredmények

5.1 Antithrombin Budapest 3, Basel, és Padua mutációk vizsgálatának eredményei

5.1.1 A heparin kötőhelyet érintő mutációt hordozó betegek klinikai és laboratóriumi jellegzetességei

A vizsgált időszakban 19 beteget diagnosztizáltunk AT Basel, 31 beteget AT Padua, és 291 beteget ATBp3 (52 homozigóta és 239 heterozigóta formában) mutációval (3. táblázat). Az AT Basel és az AT Padua mutációt hordozó betegek mind heterozigóták, mivel a homozigóta formájuk feltehetően letális. Vénás thrombosiszt regisztráltak az ATBp3 homozigóták esetében a betegek többségénél (88,8%) és a heterozigótáknál (42,1%) is relatíve gyakori

volt, míg az AT Basel betegek nagy hányadánál nem fordult elő VTE klinikai tünet az adatgyűjtés idejében. Néhány beteg az ATBp3 és AT Padua csoportokból tüdőembóliát szenvedett el, melynek nyilvánvaló forrását a képalkotó eljárások nem tudták megállapítani. Az artériás thrombosis az AT Basel csoportban volt a leggyakoribb (44,4%). A stroke-os betegeket szívvultrahanggal is vizsgálták, hogy kizárják a nyitott foramen ovale jelenlétét. A szívvultrahang nem igazolt nyitott foramen ovale-t a vizsgálatba bevont betegeknél. A terhességi komplikációk gyakorisága, úgymint a koraszülés vagy spontán abortusz, kissé emelkedett volt az AT Padua betegek körében (42,9%), de ez a különbség a másik két mutációt hordozó betegekkel összehasonlításban statisztikailag nem volt szignifikáns. Az ATBp3 homozigóták hc-anti-FXa AT aktivitás eredményeinek mediánja volt a legalacsonyabb, az összes AT aktivitás eredmény a határérték alatt volt az Innovance AT módszerrel (Siemens). Négy ATBp3 heterozigóta beteg hc-anti-FXa AT aktivitás eredménye volt a 80%-os határérték feletti. A p-anti-FXa AT aktivitás (a mérés heparin hiányában történik) szignifikánsan alacsonyabb volt az ATBp3 homozigóta és heterozigóta betegeken összehasonlítva az AT Basel és AT Padua betegekkal. A p-anti-FXa AT aktivitás és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az ATBp3 homozigótáknál a legmagasabb érték, ami azt bizonyítja, hogy ennek a genotípusnak van a legnagyobb hatása az AT heparin kölcsönhatásra. Az AT antigén eredmények az ATBp3 csoportban szignifikánsan alacsonyabbak voltak a másik két mutánshoz képest.

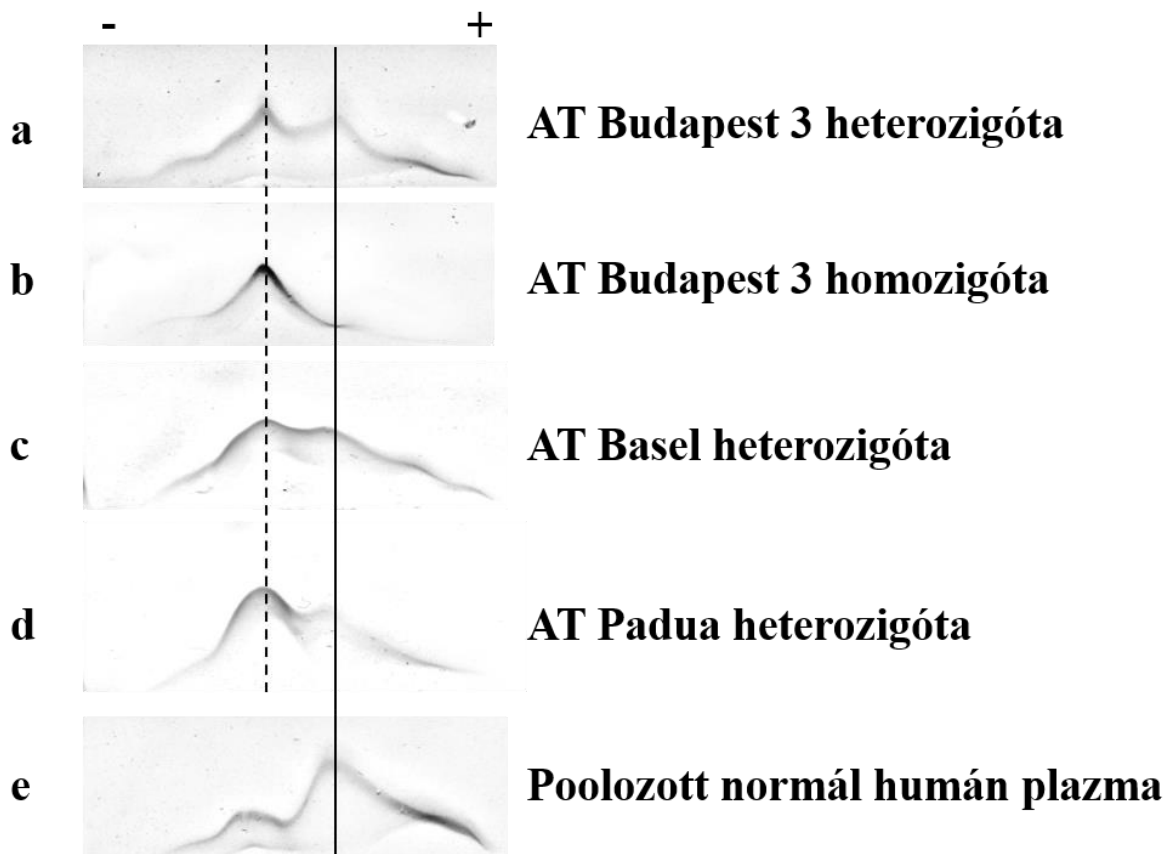
3. táblázat: IIHBS Antithrombin deficiens betegek klinikai és laboratóriumi jellemzői

	AT Basel heterozigóta	AT Padua heterozigóta	ATBp3 homozigóta	ATBp3 heterozigóta	p érték
	n=19	n=31	n=52	n=239	
Férfi/Nő	6/13	8/23	25/27	98/141	NS
Heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás (%)	58 (44-74)	57 (40-70)	17 (9-53)+	57 (36-86)	<0.001
Progresszív anti-FXa AT aktivitás (%)	100 (73-120)	106 (73-126)	73 (56-100)+	85 (60-228)++	<0.001
p-anti-FXa a hc-anti-FXa arányában	1.77 (1.25-2.05)	1.84 (1.28-2.10)	4.30 (2.06-8.40)+	1.50 (0.94-3.12)++	<0.001
AT antigén (g/L)	0.30 (0.25-0.36)	0.30 (0.24-0.35)	0.21 (0.13-0.29)+	0.24 (0.14-0.35)++	<0.001
VTE-betegek gyakorisága %	11.1	26.9	88.8§	42.1	<0.001
PE-betegek gyakorisága %	0	11.5	6.7	6.3	NS
ATE-betegek gyakoriságas %	44.4§§	7.7	6.7	7.6	0.002
Terhességi komplikációval rendelkező nők gyakorisága %	37.5	42.9	38.9	35.4	NS

Az AT aktivitás és antigén értékek és a p-anti-FXa a hc-anti-FXa arányában értékek mediánban (min-max) vannak megadva. Referencia tartományok: hc-anti-FXa aktivitás, 80-120%; p-anti-FXa aktivitás, 82-118%; AT antigén, 0,19-0,31 g/L. VTE = vénás thromboembolia, PE = pulmonális embólia, ATE = artériás thromboembolia. + Heparin kofaktor anti-FXa AT aktivitás (hc-anti-FXa), Progresszív anti-FXa AT aktivitás (p-anti-FXa), AT antigen és a p-anti-FXa AT aktivitás aránya a hc-anti-FXa AT aktivitáshoz az ATBp3 homozigóták esetében szignifikáns különbséget mutatott összehasonlítva az összes másik típussal Kruskal-Wallis teszttel Bonferroni korrekcióval többszörös összehasonlításban. A hc-anti-FXa AT aktivitás értékek az ATBp3, AT Padua, és AT Basel esetében statisztikailag nem voltak különbözőek. ++ Az ATBp3 heterozigóták esetében a p-anti-FXa AT aktivitás, AT antigén és a p-anti-FXa AT aktivitás aránya a hc-anti-FXa AT aktivitáshoz értékekben szignifikáns különbség volt az AT Basel és Padua megfelelő értékeihez képest. § A vénás

thromboembolia gyakorisága az ATBp3 homozigóta csoportban szignifikánsan magasabb volt az összes másik csoporthoz képest. \$\$ Az artériás thromboembolia gyakorisága az AT Basel csoportban szignifikánsan magasabb volt az összes másik csoporthoz képest.

A különböző mutációkat hordozó betegek plazmájának keresztezett immunoelektroforézis (CIE) vizsgálat eredményeként jól látható egy alacsony heparin affinitású (szaggatott vonal) és egy magas heparin affinitású (folyamatos vonal) frakció az összes heterozigóta plazma esetében (4. ábra a,c,d). Az ATBp3 homozigóta plazma esetében csak az alacsony heparin affinitású AT detektálható (4. ábra b). A heterozigóta AT Padua plazma estében a kisebb, anód felőli szabálytalan csúcs nagyobb a normál csúcsnál (4. ábra d). Ez a jelenség megegyező Girolami és munkatársai korábbi eredményeivel [88].

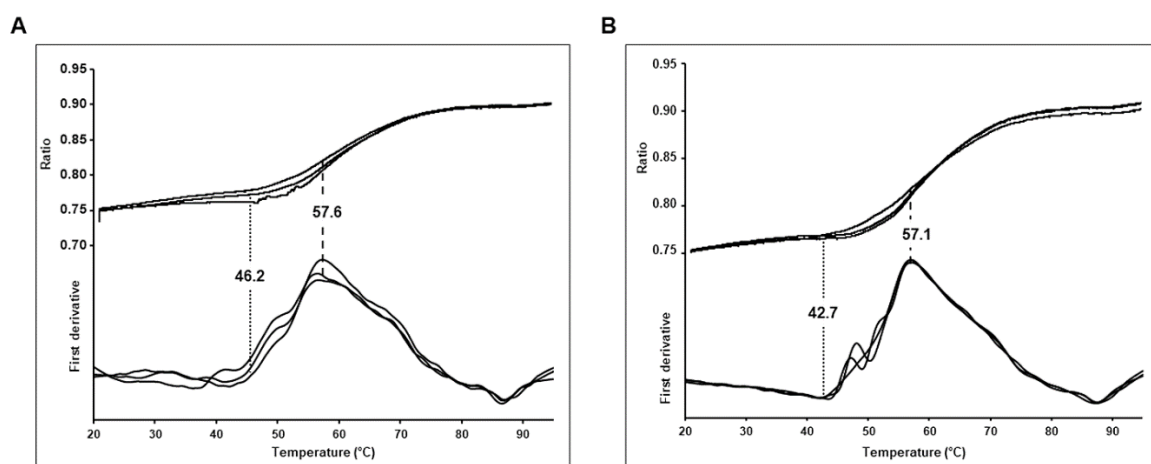


4. ábra: Normál és antithrombin mutáns plazmák keresztezett immunoelektroforézis vizsgálata. a, AT Budapest 3 heterozigóta b, AT Budapest 3 homozigóta, c, AT Basel heterozigóta, d, AT Padua heterozigóta, e, poolozott normál humán plazma. Az első dimenzió heparin tartalmú, balról jobbra futott. Bogáti Réka, Dr. Katona Éva eredményei

5.1.2 A vad típusú és a Budapest 3 homozigóta antithrombin hőstabilitása

A nano DSF (Differential Scanning Fluorimetry) kísérletek során szignifikáns különbségeket figyeltünk meg a humán plazmából szeparált ATBp3 homozigóta mutáns és vad típusú AT

összehasonlításakor ($n = 3$ független mérés) (5. ábra). A vad típusú és az ATBp3 mutáns AT fehérjék hőstabilitásának jellemzésére a triptofán fluoreszcencia 350 nm/330 nm arány változását használtuk a hőmérséklet emelkedésnek megfelelően. A fehérjék olvadási görbéjének felhasználásával két paramétert, a denaturáció kezdetét jelentő (T_{kezdeti}) és az átmenet felezőpontot (T_m), határoztunk meg. A vad típus esetében a T_{kezdeti} értéke $46.2 \pm 1.3^\circ\text{C}$ és a T_m értéke $57.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$ volt, míg a mutáns AT esetében a T_{kezdeti} értéke $42.7 \pm 1.47^\circ\text{C}$ és a T_m értéke $57.1 \pm 0.03^\circ\text{C}$ volt. Mind a T_m értéke ($p=0.0031$) és a T_{kezdeti} értéke ($p=0.0371$) szignifikánsan alacsonyabb volt az ATBp3 mutáns estében a vad típushoz hasonlítva, ezzel a mutáns fehérje alacsonyabb hőstabilitását sugallva.

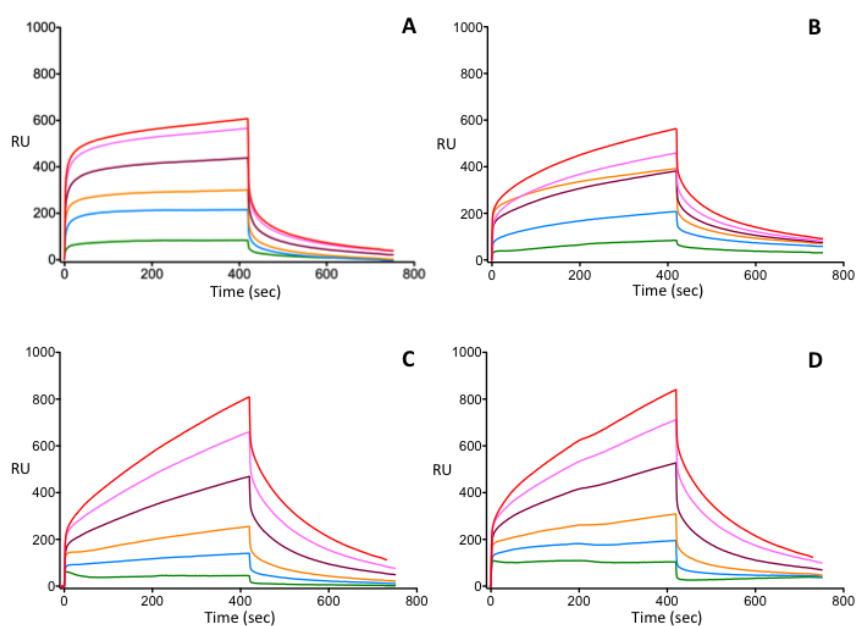


5. ábra: nanoDSF technikával kapott olvadási görbék vad típusú (A) és ATBp3 mutáns (B) antithrombin fehérje esetében. A fehérjék stabilitási paraméterei $8 \mu\text{M}$ koncentrációnál, triplikátumban lettek meghatározva Prometheus NT.48 készüléken. A pontozott vonalak a denaturáció kezdetét jelzik (T_{kezdeti}), a szaggatott vonalak az olvadás pontot (T_m) jelzik. Jól látható a különbség a vad típusú és a mutáns fehérje között, mind a T_m ($\Delta 0,5^\circ\text{C}$) és a T_{kezdeti} ($\Delta 3,5^\circ\text{C}$) értékek tekintetében, amely sugallja a hőstabilitásuk közötti különbséget. Mivel az ATBp3 mutáns olvadási hőmérséklete alacsonyabb ($57,1^\circ\text{C}$), ezért a hőstabilitás is feltehetően alacsonyabb, mint a vad típusú antithrombiné. Dr. Péntes-Daku Krisztina, Dr. Bécsi Bálint eredményei.

5.1.3 Heparin kötő képesség vizsgálatának eredményei

Az AT Basel és az AT Padua mutációt hordozó betegek mind heterozigóták, mivel a homozigóta formájuk feltehetően letális. Ezért a heparin kötő képesség részletesebb vizsgálata betegekből származó plazma mintákon nem lehetséges a normál allélról átíródó

normál AT zavaró jelenléte miatt. Vizsgálatainkhoz ezért létrehoztuk a különböző II HBS típusú mutációk és a vad típus AT in vitro előállított, tisztított rekombináns változatát. A 6. ábrán az SPR kísérletek során kapott szenzorgramok láthatók a vad típusú és a három különböző mutáns AT esetében. A hatféle különböző AT koncentrációnál kapott szenzorgramokból számolt paramétereket átlagoltuk az egyes antithrombinoknál (6. ábra). Ahogy vártuk, a legerősebb AT-heparin kötés a vad típus estében volt megfigyelhető ($K_D = 6.4 \times 10^{-10}$ M, $K_A = 2.2 \times 10^9$ 1/M). Az asszociációs állandó (k_a) a legmagasabbnak ($k_a = 1.37 \times 10^7$ 1/Ms) a vad típusnál adódott a vizsgált tisztított rekombináns AT fehérjék közül. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT-heparin komplex a leggyorsabban a vad típusú AT esetében alakul ki. A disszociációs állandó az összes mutáns esetében hasonló nagyságrendű volt (10^{-3}). (A vad típusú AT tekintetében $k_d = 6.75 \times 10^{-3}$ 1/s).



6. ábra: A vad típusú és a mutáns AT fehérjék antithrombin-heparin kölcsönhatásának vizsgálata SPR módszerrel. A vad típusú és a mutáns AT fehérjék a transzfektált HEK-293 sejtek felülcszójából voltak tisztítva affinitás kromatográfiával. Az egyes AT minták hat különböző koncentrációban (1, 3, 5, 7, 9, és 11 nM, az ábrán az alsó vonalaktól a felsőig) voltak injektálva a chip 4 különböző kamrájába. Az ábrán a vad típusú és a három különböző mutáns AT fehérje eredményei (szenzorgramok) láthatóak: A, vad típus B, ATBp3, C, AT Basel, D, AT Padua. Az SPR szenzorgramok a vizsgált AT kötődését mutatják a heparinhoz különböző koncentrációknál. RU, response unit (válasz egység) Dr. Péntes-Daku Krisztina, Dr. Bécsi Bálint eredményei

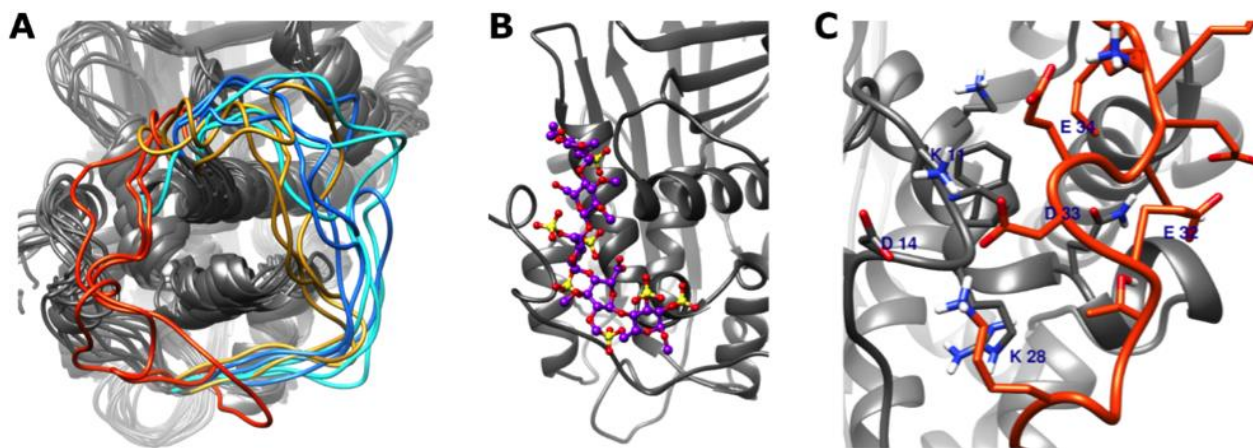
A mutáns AT fehérjék közül az ATBp3 alakította ki a legstabilabb komplexet a heparinnal ($K_D = 2.15 \times 10^{-8} \text{ M}$, $K_A = 1.62 \times 10^8 \text{ 1/M}$) és a komplex kialakulása is itt volt leggyorsabb ($k_a = 3.25 \times 10^5 \text{ 1/Ms}$). A disszociációs állandó az ATBp3 mutánsra vonatkozólag $k_d = 2.47 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$. A vad típusú fehérje eredményeivel összehasonlítva az ATBp3 szignifikánsan gyengébb kölcsönhatásba lép a heparinnal, lassabb asszociációs állandóval. Humán plazmából izolált WT és ATBp3 homozigóta mutáns fehérjékkel végzett SPR vizsgálatok is körülbelül két nagyságrendű különbséget mutattak a K_D értékekben (az eredményt itt nem mutatjuk be). Az AT Basel mutáns vonatkozásában az asszociációs/disszociációs kinetika és az egyensúlyi paraméterek a következők: $k_a = 1.03 \times 10^4 \text{ 1/Ms}$ és $k_d = 4.45 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$; $K_D = 7.64 \times 10^{-7} \text{ M}$ és, $K_A = 2.40 \times 10^6 \text{ 1/M}$. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT Basel sokkal lassabban kötődik a heparinhoz, mint a WT AT és az ATBp3, és az asszociációs konstansa is majdnem egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint az ATBp3 mutánsnak. Az összes mutáns közül az AT Padua rendelkezik a leggyengébb kölcsönhatással a heparinnal ($K_D = 1.08 \times 10^{-6} \text{ M}$, $K_A = 2.37 \times 10^6 \text{ 1/M}$) és a leghalványabb komplex kialakulással ($k_a = 1.01 \times 10^4 \text{ 1/Ms}$). Azonban a disszociációs állandója ($4.51 \times 10^{-3} \text{ 1/s}$) majdnem megegyező a többi mutáns esetében mért k_d értékkel.

5.1.4 A vad típusú és a három IIBS típusú mutáns AT fehérje in silico modellezése

5.1.4.1 A 22-46 hurok konformációja

A heparin kötő hely közelében lévő 22-46. aminosavak által határolt hurokról feltételezzük, hogy szerepet játszik az AT-pentaszacharid kötés szabályozásában [89]. Ez a hurok nagyon hajlékony és sok aminosavának pozíciója nem tisztázott a röntgen-diffrakciós szerkezetekben. Ezen kísérleti adatok hiányának ellenére a „javított” mintavételezésű MD szimulációk segítségével tanulmányozni tudjuk a hurok konformációját. Mivel a molekula modellezés során az érett fehérje szerkezetét használtuk, ezért az egyes részek számozása az in silico kísérletekben a klasszikus számozást követi, vagyis az érett fehérje első aminosava a +1. (ATBp3 megfelelője így a Leu99Phe, AT Basel megfelelője a Pro41Leu és az AT Padua megfelelője a Arg47His.) A vizsgált mutációk által érintett aminosavak közül a Pro41 (AT Basel pozíciója) helyezkedik el a 22-46 hurokban, így a hurok konformációja fontos faktor lehet ezen variáns csökkent heparin affinitásában. A nem aktivált AT Basel variáns (Pro41Leu) két szimulációjában a konformációk két fő típusát figyeltük meg. Az első típusban a hurok a heparin kötő helyhez nagyon közeli pozíciót foglal el, só hidakat és hidrogén kötésekkel alakítva ki ezen rész aminosavaival (7. ábra). A második típusban,

leginkább a másik 600 ns trajektóriában megfigyelve, a távolság a heparin kötő helytől nagy volt. Ez a jelenség a hurok jelentősen fokozott konformációs változékonyságára utal összehasonlítva a vad típussal, emiatt néhány konformáció potenciálisan akadályozó lehet a heparin pentaszacharid kötésében.



7. ábra: Az antithrombin 22-46 hurok in silico szimulációja. A, Minden egyes trajektória három konformációjának csoportosítással kapott jellegzetes szerkezeteinek egymásra helyezése két vad típusú és két Pro41Leu pentaszacharid nélküli szimuláció esetében. A 22-46 hurok sárgával és narancssárgával van jelölve a Pro41Leu esetében, és a kék két különböző árnyalatával a vad típusú szimulációnál. B, Az idraparinux pentaszacharid feltételezett kötési helye összehasonlításként. A pentaszacharid 1NQ9 röntgen-diffrakciós szerkezetének módosításával (részletesen lásd a szövegben) és energia minimalizálásával nyert szerkezet. C, A 22-46 hurok aminosavai és az AT fehérje pentaszacharid kötő régió között kölcsönható aminosavak az egyik Pro41Leu rendszer jellegzetes szerkezetében. A reprezentatív szerkezeteket a CPPTRAJ szoftver által végrehajtott K-means csoportosítással választottuk ki [80]. Dr. Balogh Gábor elemzése

Azonban a pentaszacharid kötött (aktív) AT szimulációban nem volt megfigyelhető a szoros kapcsolat a hurok és a heparin kötő régió között. Ez azt sugallja, hogy a hurok megváltozott konformációjának valószínűleg nincs vagy csak kicsi a destabilizáló hatása a pentaszacharid kötésre, miután egy „erős” komplex már létrejött. A pentaszacharid erősen töltött természete és a megváltozott elektrosztatikus hatások meg tudják gátolni, hogy a hurok átmenjen az alternatív konformációba.

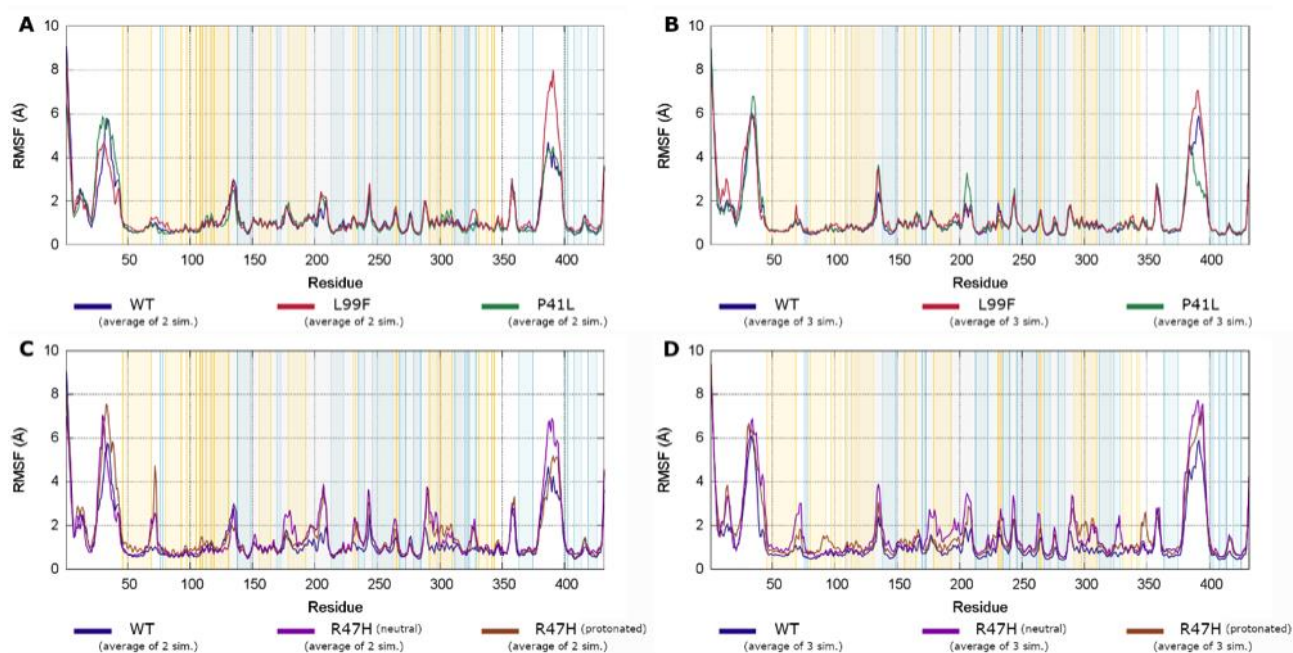
5.1.4.2 Az antithrombin fehérje N-terminális részének DSSP (Define Secondary Structure of Proteins) analízise

Elemeztük az N-terminális rész másodlagos szerkezetének változásait (az elemzésben az 1-145 aminosavak szerepeltek, ez a szakasz tartalmazza az egész heparin kötő helyet, de nem tartalmazza az „A” béta redőt) DSSP módszer alkalmazásával [81], a CPPTRAJ szoftver segítségével [80]. Ezt az elemzést elvégeztük mind a „nem aktivált AT” (1T1F) és a „AT-pentaszacharid komplex” (1NQ9) rendszerekben. Az 1T1F alapú rendszert illetően a konformációs változások nyilvánvalóak voltak az AT Basel szimulációk esetében az előző részben ismertetett területen a vad típusú AT-al összehasonlítva. Azonban nem volt látható szignifikáns konformáció változás a heparin kötő régiókban, beleértve a P hélixet (112-120 aminosavak) (a P hélix konformációjának GAMD-ben történő szimulációjának megbeszéléséről lásd a [90] hivatkozást.) A „komplex” szimulációk közül az AT Padua (Arg47His) variáns (és főleg a semleges formája) mutatott konformációs változásokat a 30-35 régióban. Hasonlóan az 1T1F alapú szimulációkhoz, itt sem volt szignifikáns konformáció változás a heparin kötő területen. Egy kis mértékű D hélix meghosszabbodás volt látható az ATBp3 (Leu99Phe) trajektóriák esetében összehasonlítva a vad típusal.

5.1.4.3 Root Mean Square Fluctuations (RMSF) analízis

A Root Mean Square Fluctuations (RMSF) egy általános vizsgálati módszer egy fehérjét felépítő aminosavak flexibilitásának leírására. Használhatjuk misszensz mutációk által okozott fluktuáció növekedés mérésére. Továbbá konformációs változások okozhatnak növekedést vagy csökkenést a fluktuációban a molekula specifikus részein. A „nem aktivált” AT szimulációk közül az ATBp3 variáns mutatott mérsékelt növekedést a fluktuációban a vad típusú fehérjéhez és az AT Basel variánshoz képest (8. ábra A). Fluktuáció növekedést figyeltünk meg a fehérjében mind az érintett aminosavhoz (99. aminosav) közeli részeken (aminosavak 50-100), mind távolabbi régiókban (aminosavak: 320-330, 360-380, és 420-430). A fluktuáció növekedések kis mértékűek voltak viszont a harmadlagos szerkezet más részein. Ezek az eredmények összhangban megfelelnek egy variánsnak, melyben a natív konformáció stabilitása mérsékeltlen csökkent, de még számottevő mennyiségben szekrécióna tud kerülni. Az AT Basel variáns esetében a fluktuáció növekedések főleg a 110-130 és a 300-320 aminosav régiókban voltak megfigyelhetőek. A legérdekesebb eredményt az AT Padua variáns esetében kaptuk, ahol jelentősen megnövekedett fluktuáció volt megfigyelhető (8. ábra C) a 47-es reziduom mindkét féle protonált állapotában. A növekedések különösen

nagyok voltak az F hélixhez közeli régióban (180-210) és a 290-310 régió héliceiben. Ez arra enged következtetni, hogy ez a variáns hatással van a molekula távoli részeinek konformációjára és még az allosztériát is befolyásolja a molekula távoli részein. A heparin aktivált státuszra vonatkozólag az RMSF értékektől azt vártuk, hogy tükrözzék a harmadlagos szerkezet stabilitásában bekövetkező változást, hasonlóan a nem aktivált státuszhoz. Azonban azt tudjuk, hogy az átlagosnál nagyobb fluktuációkkal rendelkező területek konformációs változásai, melyről ismert, hogy részt vesznek az allosztérikus mechanizmusban, szintén ki tudja váltani az RMSF növekedést. Ebben a folyamatban résztvevő régiókhöz tartozik a D hélix C-terminális vége, a reaktív hely hurok (RCL) és a FXa-val és a FIXa-val kölcsönható exosite. Az ATBp3 variáns növekedést mutatott a fluktuációban a vad típushoz képest, hasonlóan a „nem kötött” státuszhoz. A D hélix C-terminális vége (125-135 aminosavak) játszik fontos szerepet az allosztérikus aktivációban. A vad típusú rendszer esetében szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a „kötött” állapotban, amikor összehasonlítottuk a nem aktivált WT AT-al (8. ábra B). Azonban nem ez volt a helyzet az ATBp3 és az AT Basel variánsoknál, az RMSF értékek magasak maradtak a „kötött” állapotban is (8. ábra B,D). Az AT Padua variáns tekintetében az eleve jelentősen megnövekedett fluktuációk, amelyeket az 1T1F alapú, vagyis a nem kötött AT-t reprezentáló rendszerekben megfigyeltünk, szintén megfigyelhető volt ennek a variánsnak a heparin kötött szimulációiban is. A legnagyobb növekedést mutató régiók megközelítőleg azonosak voltak a két típusú rendszerben az AT Padua mutációra vonatkozólag (8. ábra D).



8. ábra: Root mean square fluctuations (RMSF) a Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (GAMD) trajektóriákból. Kettő (1T1F, nem aktivált) vagy három (1NQ9, AT-pentaszacharid komplex) független szimulációból származó átlagok vannak ábrázolva. Az ábra részei: (A,C) mutatja a nem aktivált AT szimulációkat, míg a (B,D) az AT-pentaszacharid komplex trajektóriáit. Az egyes eredmények hátterei a régió másodlagos szerkezetének megfelelően van színezve (narancssárga – α -helix, kék – β -redő). Dr. Balogh Gábor elemzése

5.1.4.4 Az allostérikus útvonalak vizsgálata

Az AT konformációs aktiválása alapvetően egy allostérikus folyamat, amelyben a heparin kötő hely, a reaktív hely hurok, és a koagulációs faktorokat kötő exosite helyek vesznek részt. Az előző munkánkhöz hasonlóan az allostérikus útvonalak vizsgálata Lange és Grubmüller által kifejlesztett módszerrel történt [91], amely összefüggő (korrelált) mozgásokat is képes detektálni a molekuladinamikai trajektóriákban. Ezt az analízist az 1T1F és a 1NQ9 alapú rendszerekben is végrehajtottuk. Általában elmondhatjuk, hogy az AT Basel variáns hasonló mintázatot mutatott, mint a vad típusú AT, jelezvén ezen mutáció valószínűleg kicsi hatását az allostériára. Ezzel ellentétben a mintázat különböző volt az ATBp3 és különösen az AT Padua mutációknál. Ez valószínűleg azt jelenti, hogy e két variáns esetében az allostérikus folyamatokban érdemi változások következtek be.

5.1.4.5 A pentaszacharid kötés vizsgálata Root Mean Square Deviations meghatározással

A röntgen-diffrakciós struktúrájának megfelelő pentaszacharid gyűrű és a glikozidos kötésben részt vevő atomok Root Mean Square Deviations (RMSDs) értékeit alkalmaztuk a ligand konformációjának a leírására. Nem volt szignifikáns különbség a pentaszacharid RMSD értékei között a WT, AT Basel és ATBp3 szimulációk esetében. Ellenben az AT Padua protonált variánsa emelkedést mutatott a pentaszacharid RMSD értékeiben az összes többi szimulációhoz viszonyítva. Teljes vagy közel teljes disszociációja a ligandnak nem volt megfigyelhető egyik szimulációban sem a szimulációs időn belül. Meg kell jegyezzük, hogy az erősebb AT – heparin kölcsönhatás valószínűleg annak a következménye, hogy az összes vizsgált variáns glikozilációs mintázata a β -AT-nak megfelelő. A szimulációkban a β -AT használatának az oka az, hogy az α -AT-ban a kötő helyhez közel lévő nagy oligoszacharid megnehezíti a megfelelő konformációs mintavételt. Nagyon terjedelmes molekuladinamikai

szimulációra lenne szükség ahhoz, hogy pontosabb „átlagot” kapjunk a glikán és a pentaszacharid közötti kölcsönhatásra.

5.2 A kilenc új antithrombin mutáns vizsgálatának eredményei

5.2.1 Az antithrombin deficiens betegek klinikai és laboratóriumi jellegzetességei

2016 -2021 között a DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszéken diagnosztizált AT deficiens betegek többsége az alapító hatású AT Budapest 3 (p.Leu131Phe) mutációt hordozta. Azonban találtunk kilenc új *SERPINCI* mutációt is, melyek az irodalomban eddig nem szerepeltek vagy a mi munkacsoportunk által voltak először közölve [51]. Ezek a mutációk a különböző adatbázisokban nem szerepelnek (Human Gene Mutation Database <http://www.hgmd.cf.ac.uk>; és a ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>, utolsó belépés 2023. November 11). Ellenőriztük a 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>, utolsó belépés 2023. November 11) adatbázist is, ahol polimorfizmusként sem találhatóak meg. Az általunk vizsgált összes beteg heterozigóta volt ezekre az új mutációkra nézve (3. táblázat). Két beteg (apa és fia) hordozta a c.41G>A (p.Arg14Lys) mutációt. A plazma mintájukban csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás és csökkent progresszív anti-FXa AT aktivitás volt mérhető. Az AT antigén koncentráció is csökkent volt, ami inkább kvantitatív ATD-re utalt. A férfi beteg 16 éves korában szenvedett el mélyvénás thrombosis, azóta nem történt thromboticus klinikai esemény. Az apa is hordozza a kimutatott eltérést, de még nem következett be nála thrombosis. Az index beteg hosszú távú K-vitamin antagonistá kezelésben részesül, az apja nem kap antikoaguláns terápiát. A második mutációt (c.95G>A, p.Cys32Tyr) egy nőbeteg hordozza, aki első thromboticus klinikai eseményét 20 évesen terhesség alatt szenvedte el (mélyvénás thrombosis tüdőembóliával). Két visszatérő thromboticus klinikai eseményt regisztráltak: 41 évesen mesenterialis véna thrombosis és évekkel később tüdőembóliát. Az első és a második thrombosis után 1-1 évig K-vitamin antagonistá (VKA) terápián volt, azonban a harmadik thromboticus klinikai esemény után élethosszig tartó antikoaguláns kezelésre állították, kezdetben VKA-t alkalmaztak, majd váltottak rivaroxaban kezelésre (20 mg napi egyszer). A beteg családi anamnézise is pozitív thrombosis tekintetében: három fivére is szenvedett el mélyvénás thrombosis, kettő közülük tüdőembóliában hunyt el. Azonban ők nem voltak akkor thrombophilia irányában kivizsgálva. A beteg lánytestvére szülés után szenvedett el mélyvénás thrombosis. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása és a progresszív anti-FXa AT aktivitása alacsony volt és az AT antigén szintje is arányosan csökkent volt. A harmadik mutáció (c.232C>G, p.Arg78Gly) az AT heparin kötő

helyét érinti. A hordozó egy fiatal nőbeteg endometriózissal. Meddőség miatt vizsgálták, nem volt thromboticus klinikai tünete. A családi anamnézis is negatív volt thrombosisra. Az in vitro fertilizációs (IVF) kezelés előtt diagnosztizálták ATD-vel. Az IVF terápia alatt és a terhessége folyamán LMWH-t kapott, de hosszútávú antikoaguláns kezelés nem indult. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása alacsony volt, míg a progresszív anti-FXa AT aktivitása és az AT antigén szintje normál tartományba esett, ami II-es típusú HBS ATD-át véleményez. A negyedik mutáció (c.362T>G, p.Met121Arg) érintette egy fiatal nőbeteg, aki 34 évesen szenvedett el MVT-t. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A beteg hosszútávú VKA antikoagulációban részesül. Az ötödik mutáció (c.734T>C, p.Leu245Pro) hordozója egy férfi beteg, aki 42 évesen kapott proximális MVT-t. A kórtörténetében nem szerepelt provokáló tényező. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A diagnózis után hosszútávú warfarin antikoaguláns terápia lett beállítva a betegnél. A továbbiakban nem történt visszatérő thromboticus klinikai esemény. A hatodik mutációt (c.807delT, p.Leu270Argfs*14) egy férfi betegnél diagnosztizáltuk, aki ötször szenvedett el MVT-t. Az elsőt 16 évesen. Klinikai nézőpontból tekintve ez az eset mutatta a legsúlyosabb thromboticus fenotípust. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A beteg élethosszig tartó antikoaguláns kezelést kap, jelenleg rivaroxabant szed (20 mg napi egyszer). A hetedik mutáció (c.1349A>T, p.Asn450Ile) hordozója egy négytagú család, akik közül ketten szenvedtek el MVT-t 23 és 40 éves életkorban. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén eredményeik arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-t jeleztek. A 3. táblázatban szereplő 7_1 jelzésű beteg még nem szenvedett thrombosit, mindamelllett volt négy terhessége, melyből az első spontán vetéléssel végződött. A következő három terhessége alatt a beteg LMWH kezelést és AT koncentrátumot kapott, azok a terhességei sikeresen végződtek. Hosszútávú antikoaguláns kezelést nem vezettek be nála. Az index beteg lánytestvére (7_2) a terhessége alatt LMWH és AT koncentrátum terápiát kapott. Mivel az ő anamnézisében szerepelt MVT, ezért hosszútávú VKA típusú antikoagulációra lett beállítva. A 7_3 jelű beteg is VKA antikoagulációban részesül, míg a 7_4 jelű beteg nem (ő még nem szenvedett el thrombosit). A nyolcadik mutációt (c.1367-1368del,c.1367-1371ins, p.Gly456delins_Alala-Thr) egy nőbetegben azonosítottuk, aki 27 évesen terhessége alatt szenvedett el MVT-t, amit egy második (kiváltó ok nélküli) követett 5 év múlva. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, az I-es típusú ATD-nek

megfelelően. A beteg egész életen át tartó antikoaguláns terápiában részesül apixaban alkalmazásával (5 mg naponta kétszer). Végül a kilencedik mutáció (c.1384C>A, p.Pro461Thr), melyet három nem rokon betegnél is kimutattunk. Az egyikük kiváltó ok nélkül szenvedett el thrombosit, melyet tüdőembólia követett viszonylag idős életkorban (62 évesen), ő jelenleg VKA kezelést kap. A másik két beteg sokkal fiatalabb volt a thromboticus klinikai eseményüknél, azonban mindkettő MVT provokált volt. Mindkét beteg direkt oralis antikoaguláns kezelésben részesül (apixaban 5 mg napi kétszer, illetve rivaroxaban 20 mg napi egyszer). A heparin-kofaktor-anti-FXa és a progresszív anti-FXa AT aktivitás értékek aránytalanul alacsonyak voltak az AT antigén értékekhez képest, ezzel inkább funkcionális ATD-re utalva. A laboratóriumi kivizsgálást illetően az alap koagulációs tesztek a normál tartományban voltak az összes beteg esetében, vagy csak az adott antikoaguláns kezelésnek megfelelően tértek el. A thrombophilia irányú vizsgálatok két betegnél (a 3. táblázat számozása alapján: 2_1 és a 8_1 jelű betegek) APC rezisztenciát és FV Leiden heterozigotáságot mutattak ki, egyéb thrombofiliát nem igazoltunk.

4. táblázat: A vizsgált betegek genotípus-fenotípus összefüggései

Sorszám	Nukleotid Pozíció (Elnevezés a HGVS alapján)	Aminosav Pozíció (Elnevezés a HGVS alapján)	Beteg azonosító	hc-antiFXa		p-AntiFXa	AT	Kor az első		Kor a	Provokált trombózis (igen/nem)	Visszatérő trombotikus események (igen/nem)	Antikoaguláns terápia
				Nem	Aktivitás (%)	Aktivitás (%)	Antigén (g/L)/	Tünetek	esemény idején (évek)	diagnózis idején (évek)			
1	c.41G > A	p.Arg14Lys	1_1	f	63	79	0.16	1 MVT	16	23	Nem	Nem	VKA
			1_2 (1_1 apja)	f	53	76	0.13	Nem	-	47	-	-	Nem
2	c.95G > A	p.Cys32Tyr	2_1	n	60	75	0.15	2 MVT, 1 PE	20	41	Igen, terhesség	Igen	RIVA 1 × 20 mg
3	c.232C > G	p.Arg78Gly	3_1	n	54	94	0.27	Nem	-	34	-	-	Nem
4	c.362T > G	p.Met121Arg	4_1	n	52	53	0.13	1 MVT	34	41	Nem	Nem	VKA
5	c.734T > C	p.Leu245Pro	5_1	f	59	65	0.18	1 MVT	42	43	Nem	Nem	VKA
6	c.809delT	p.Leu270Argfs*14	6_1	f	56	60	0.16	5 MVT	16	59	Nem	Igen	RIVA 1 × 20 mg
7	c.1349A > T	p.Asn450Ile	7_1	n	49	52	0.14	Nem	-	27	-	-	Nem
			7_2 (7_1 testvére)	n	55	60	0.15	1 MVT	23	30	Nem	Nem	VKA
			7_3 (7_1 apja)	f	59	62	0.16	2 MVT	40	55	Nem	Igen	VKA
			7_4 (7_1 unokatestvére)	f	60	59	0.15	Nem	-	27	-	-	Nem
8	c.1367- 1368delGCinsCTACA	p.Gly456delins_Ala-Thr	8_1	n	54	46	0.15	2 MVT	27	33	Igen, terhesség	Igen	API 2 × 5 mg
9	c.1381C > A	p.Pro461Thr	9_1	n	31	ND	0.21	1 MVT + PE	62	62	Nem	Nem	RIVA 1 × 20mg
			9_2	f	55	58	0.18	1 MVT	48	64	Igen, hosszú repülőút	Nem	VKA
			9_3	n	55	62	0.18	1 MVT	27	30	Igen, OA	Nem	API 2 × 5mg

Rövidítések: HGVS, Human Genome Variation Society; ND, nincs adat; f, férfi; n, nő; MVT, mélyvénás thrombosis; PE, tüdőembólia; OA, orális antikoncepció; VKA, K-vitamin antagonisták; API, apixaban; RIVA, rivaroxaban. Referencia tartományok: hc-anti-FXa aktivitás, 80-120%; p-anti-FXa aktivitás, 82-118%; AT antigén, 0,19-0,31 g/L. 2_1 és 8_1 azonosító számú betegek FV Leiden heterozigóták. A betegeknél más thrombosisra hajlamosító tényező nem volt regisztrálva.

5.2.2 Antithrombin szekvencia homológia vizsgálatának eredménye

A patogenitás indirekt bizonyítékának tekinthető, amint az jól tudott, hogy a betegséget okozó mutációk a fehérje erősen konzervált pozícióiban találhatóak [92].

Ezért elvégeztük a kilenc új mutáció szekvencia homológia azonosítását hét különböző fajban az UniProt fehérjeszekvencia adatbázis segítségével (9. ábra). A vizsgált aminosav pozíciókban, mind a hét faj esetében, azonos aminosavakat találtunk (kivéve a 270-es pozíciót, ahol három faj esetében leucin helyett prolin van, ezek azonban hasonlóak egymáshoz, nem poláros aminosavak hidrofób oldalláncokkal). Ezek alapján elmondhatjuk, hogy minden mutáció esetében erősen konzervált pozícióról van szó. A Közönséges csimpánz (*Pan troglodytes*) esetében megfigyeltük az aminosavak egyezését nemcsak a vizsgált összes pozícióban, hanem az azokat körülvevő régiókban is. Megfigyeltük továbbá, hogy a 78-as és a 121-es pozíciók és környezetük is mind a hét faj esetében azonos. A szignál peptid szekvenciája heterogén a hét faj esetében, de elkülöníthetünk három konzervált részt: az N terminális részen egy hidrophil részt, egy hidrofób középső részt és a poláris C terminális régiót. A 32-es pozíció a konzervált poláris C terminális részen van, ahol a szignál peptid lehasító helye található.

		Arg14		Cys32			Arg78																																																																											
H. sapiens	1	MYSNVIGT	VTS	GK	KVYLLSLLIGF	WDCVTC	HGSP	VDICTAKPRDIPM	49	50	NPMC	IYR	-----	SPEKKATE	DEGSEQ	---	KIPEATN	RRVWELSKANSRF	90																																																															
P. troglodytes	1	MYSNVIGT	VTS	GK	KVYLLSLLIGF	WDCVTC	HGSP	VDICTAKPRDIPM	49	50	NPMC	IYR	-----	SPEKKATE	DEGSEQ	---	KIPEATN	RRVWELSKANSRF	90																																																															
M. mulatta	1	MYSNVIGT	VAS	GK	KVYLLSLLIGL	WDCMT	HGSP	VDICTAKPRDIPM	49	50	NPMC	IYR	-----	SPEKKATE	DEGSEQ	---	KIPEATN	RRVWELSKANSRF	90																																																															
C. lupus	1	MFSNGIGM	IAAG	K	R	TCLLSLLIGL	WGC	VP	WPSPG	EDICTAKPRDIPV	50	51	NPMC	IYR	-----	SPEKKA	VEDEGA	EQ	---	KIPEATN	RRVWELSKANSRF	91																																																												
B. taurus	1	MISNGIGT	V	TAG	K	SICLLPLLL	IGL	WG	CVTC	HRSP	VEDICTAKPRDIPV	50	51	NPMC	IYR	-----	SPEKKA	T	EGGSEQ	---	KIPGATN	RRVWELSKANSRF	91																																																											
M. musculus	1	MYS	PGAGS	GA	AE	R	KLCLLSLL	IGAL	GCAI	C	HGNP	VDDICIAKPRDIPV	50	51	NPLC	IYR	-----	SPGK	ATE	DEGSEQ	---	KVPEATN	RRVWELSKANSRF	91																																																										
R. norvegicus	1	MYS	PGIGS	A	V	A	E	R	KLCLLSLL	IGAL	GCAV	C	HGNP	VDDICIAKPRDIPV	50	51	NPMC	IYR	-----	SPAKKATE	E	DVLEQ	---	KVPEATN	RRVWELSKANSRF	91																																																								
					Met121			Leu245									Leu270																																																																	
H. sapiens	91	ATTFYQ	H	L	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	D	T	L	Q	L	M	E	V	137	237	E	A	I	N	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	L	F	Y	K	A	D	G	E	S	C	S	A	S	M	M	Y	Q	286	
P. troglodytes	91	ATTFYQ	H	L	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	D	T	L	Q	L	M	E	V	137	237	E	A	I	N	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	L	F	Y	K	A	D	G	E	S	C	S	A	S	M	M	Y	Q	286	
M. mulatta	91	ATTFYQ	H	L	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	D	T	L	Q	L	M	E	V	137	237	E	A	I	N	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	M	E	P	F	Y	K	A	D	G	E	S	C	S	A	S	M	M	Y	Q	286	
C. lupus	92	ATAFYQ	H	V	A	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	T	L	Q	L	M	E	V	138	238	D	A	I	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	L	F	Y	K	A	D	G	E	S	C	S	V	S	M	M	Y	Q	287		
B. taurus	92	ATAFYQ	H	L	A	---	DSKNN	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	D	T	L	Q	L	M	E	V	138	238	Q	A	I	N	E	F	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	L	F	Y	K	A	D	G	E	S	C	V	L	M	M	Y	Q	287	
M. musculus	92	ATNFYQ	H	L	A	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	D	T	L	Q	L	M	E	V	138	238	G	A	I	N	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	P	F	Y	K	V	D	G	Q	S	C	P	V	P	M	M	Y	Q	287
R. norvegicus	92	ATNFYQ	H	L	A	---	DSKND	NDN	N	F	L	S	I	S	T	A	F	A	M	T	K	L	G	A	C	N	T	L	Q	L	M	E	V	138	238	G	A	I	E	L	T	V	L	V	L	N	T	I	F	K	L	W	K	S	F	P	E	N	T	R	K	E	P	F	H	K	V	D	G	Q	S	C	L	V	P	M	M	Y	Q	287		
										Asn450		Gly456		Pro461																																																																				
H. sapiens	420	VVIA	----	GRSLN	PN	RV	TFKAN	RP	FLV	FIRE	VPL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	V	K	-	464																																																							
P. troglodytes	420	VVIA	----	GRSLN	PN	RV	TFKAN	RP	FLV	FIRE	VPL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	V	K	-	464																																																							
M. mulatta	420	IGIA	----	GRSLN	PN	RV	TFKAN	RP	FLV	FIRE	VPL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	V	S	-	464																																																							
C. lupus	421	IGIA	----	GRSLN	PN	RV	TFKAN	RP	FLV	LIRE	VAL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	D	N	-	465																																																							
B. taurus	421	ISIA	----	GRSLN	S	D	R	V	TFKAN	RP	ILV	LIRE	VAL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	V	D	-	465																																																					
M. musculus	421	VVIT	----	GRSLN	PN	RV	TFKAN	RP	FLV	LIRE	VAL	N	T	I	F	M	G	R	V	A	N	P	C	V	N	-	465																																																							
R. norvegicus	421	VVIT	----	GRSLN	P	S	R	V	TFKAN	RP	FLV	LIRE	VAL	N	T	I	F	M	G	R	V	S	N	P	C	V	N	-	465																																																					

9. Ábra: Hét különböző faj antithrombin szekvencia homológiájának vizsgálata az UniProt adatbázis segítségével (<http://www.uniprot.org>). Az aminosavak egy betűs rövidítése: Alanin, A; Arginin, R; Aszparagin, N; Aszparaginsav, D; Cisztein, C; Glutamin, Q; Glutaminsav, E; Glicin, G; Hisztidin, H; Izoleucin, I; Leucin L; Lizin, K; Metionin, M; Fenilalanin, F; Prolin, P; Szerin, S; Treonin, T; Triptofán, W; Tirozin, Y; Valin, V. A vizsgált fajok: Homo sapiens, (Ember), Pan troglodytes, (Közönséges csimpánz), Macaca mulatta, (Rézusmajom), Canis lupus, (Szürke farkas), Bos taurus, (Szarvasmarha), Mus musculus, (Házi egér), Rattus norvegicus, (Vándorpatkány). A számok az egyes fehérje szekvenciákban az aminosavak számát jelentik. A vizsgált mutációk pozíciójában lévő aminosavakat dőlt, kiemelt betűvel és aláhúzással jelöltük.

5.2.3 A misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója

A hét misszensz mutációt vizsgáltuk hat különböző webes felületen elérhető alkalmazás segítségével, amelyekkel megjósoltuk az egyes mutációk következményét (5. táblázat). A PolyPhen2 eszköz a humán fehérjékben bekövetkező aminosav cserék következményeit jelzi előre. Több forrásból származó információt vesz tekintetbe, úgymint homológ szekvenciákat, szerkezeti sajátosságokat, és 3D struktúrákat [82]. A MutPred2 gépi tanulási modellt használ, a PhD-SNP egy Support Vector Machine (SVM)-alapú csoportosító a misszensz mutációk számára, amely figyelembe veszi a mutációt, a szekvencia környezetét és a szekvencia profilját [85]. A SIFT egy szekvencia homológia alapú módszer, a MutationTaster program a DNS szekvencia alapján jósolja meg a variánsok és a mutációk következményét. A következő mutációk esetében mind a hat módszer patogénnek vagy betegséget okozónak jósolta az eltérést: p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, és p.Pro461Thr. A p.Arg78Gly mutációval kapcsolatban, ami egy, a heparin kötő hely közelében lévő aminosavat érint, nem voltak egységesek az eredmények. Egyes alkalmazások patogénnek, mások benignusnak jósolták a következők szerint: a PolyPhen 2 program (mindkét érték) és a PhD-SNP jóindulatúnak értékelte, de az összes többi patogénnek. Két misszensz mutáció, a p.Arg14Lys és a p.Cys32Tyr, az AT szignál szekvenciáján helyezkedik el. A PolyPhen 2 és a SIFT programok ártalmatlanak jósolták ezeket a mutációkat, míg a MutPred2 és a MutationTaster nem patogénnek ítélte őket. A PhD-SNP az első mutációt jóindulatúnak a másodikat betegséget okozónak sorolta be. Végrehajtottunk egy in silico vizsgálatot a szignál peptid hasítására a SignalP 6.0. program segítségével az ezen a szekvencián elhelyezkedő mutációk esetében. A SignalP 6.0. program a szignál peptid hasító helyet a 32-es és a 33-as aminosav közé jósolta a vad típusú és a p.Arg14Lys mutáns esetében nagy megbízhatósággal (>0,999). A p.Cys32Tyr

vonatkozásában a program a hasító helyet szintén a 32-es pozíció után helyezte, de a predikció megbízhatósága nagyon alacsony volt, csak kicsivel volt 0,5 felett (0,542).

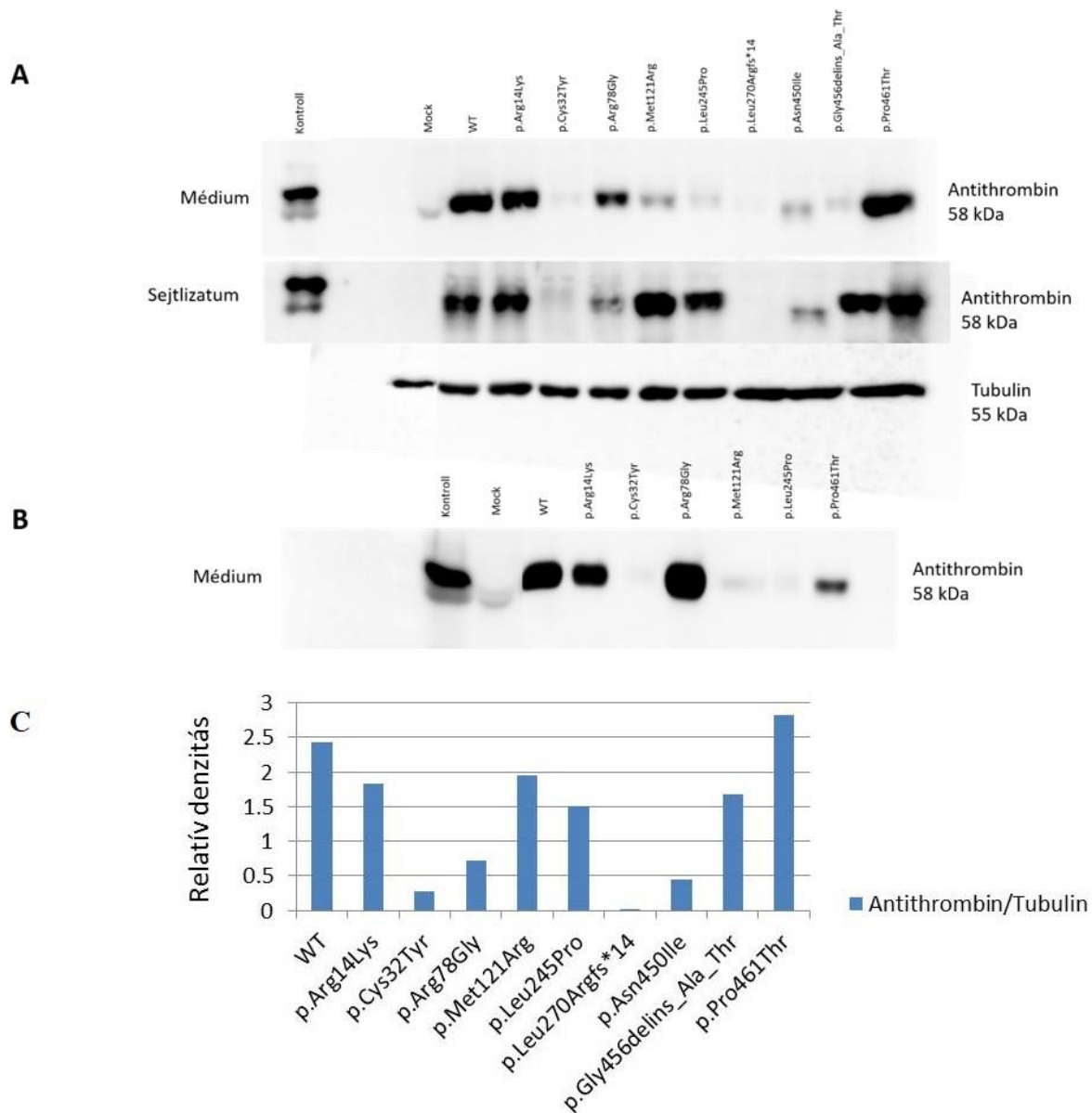
5. táblázat: A misszensz mutációk következményeinek in silico predikciója Dr. Balogh Gábor elemzése

	PolyPhen2 HumDiv	PolyPhen2 HumVar	MutPred2	PhD-SNP	SIFT	MutationTaster
p.Arg14Lys	Valószínűleg káros (0.994)	Valószínűleg káros (0.970)	Nem patogén (0.273)	Semleges (0.355)	Fehérje funkciót érintő * (0.00)	Polimorfizmus (0.7298)
p.Cys32Tyr	Valószínűleg káros (0.981)	Talán káros (0.635)	Nem patogén (0.415)	Betegséget okozó (0.868)	Fehérje funkciót érintő * (0.00)	Polimorfizmus (0.6706)
p.Arg78Gly	Jóindulatú (0.126)	Jóindulatú (0.031)	Patogén (0.665)	Semleges (0.371)	Fehérje funkciót érintő * (0.00)	Betegséget okozó (1.0000)
p.Met121Arg	Valószínűleg káros (1.000)	Valószínűleg káros (1.000)	Patogén (0.944)	Betegséget okozó (0.889)	Fehérje funkciót érintő (0.00)	Betegséget okozó (1.0000)
p.Leu245Pro	Valószínűleg káros (1.000)	Valószínűleg káros (1.000)	Patogén (0.952)	Betegséget okozó (0.897)	Fehérje funkciót érintő (0.00)	Betegséget okozó (1.0000)
p.Asn450Ile	Valószínűleg káros (1.000)	Valószínűleg káros (0.999)	Patogén (0.839)	Betegséget okozó (0.840)	Fehérje funkciót érintő (valószínűség: 0.01)	Betegséget okozó (1.0000)
p.Pro461Thr	Valószínűleg káros (0.999)	Valószínűleg káros (0.972)	Patogén (0.724)	Betegséget okozó (0.703)	Fehérje funkciót érintő (valószínűség: 0.00)	Betegséget okozó (1.0000)

*SIFT alacsonyabb megbízhatóságot mutatott ezen predikciók esetében

5.2.4 A vad típusú és a kilenc mutáns AT kimutatása a transzfektált sejtek sejtlizátumából és a felülúszóból Western blot technikával

A HEK-293 sejtek felülúszójából és sejtlizátumából Western blot technikával a vad típusú AT 58 kDa-nál erős sávként detektálható. Pozitív kontrollnak 5 egészséges egyén poolozott plazmáját használtuk és erős sávként detektáltuk az AT fehérjét. Negatív kontrollként a mock transzfekció mintáját alkalmaztuk, és ahogy vártuk, nem kaptunk szignált. A tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából a következő mutációk esetében detektáltunk erős sávot 58 kDa-nál: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, és p.Pro461Thr. Halvány sávot vagy még annyit se a következő esetekben detektáltunk: p.Cys32Tyr, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, és a p.Gly456delins_Ala_Thr. A tranziensen transzfektált sejtek sejtlizátumában a következő esetekben tudtunk AT-t kimutatni: p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr és a p.Pro461Thr. A p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile esetében az AT hiányzik vagy csak nagyon halvány sávként jelenik meg (10. ábra A része).



10. ábra: A vad típusú és a mutáns antithrombinok kimutatása Western blot technikával a tranziensen (A) és a stabilan (B) transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából és a sejtek lizátumából. A tranziens transzekció sejtlyizátum mintáinak denzitometriás értékelése (C). Az SDS-PAGE nem-redukáló körülmények között volt kivitelezve. A sejt lizátumok esetében a tubulin (55 kDa) szolgált külső kontroll fehérjeként. A Mock-transzfektált sejtek negatív kontrollként, a 40-szeres hígításban felvitt poolozott plazma pozitív kontrollként szolgált.

A Western blot analízis alapján a mutációkat három csoportba soroltuk. Az első csoport magában foglalta a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutánsokat, melyeknél alacsony AT fehérje expressziót detektáltunk mind a felülúszóban mind a sejtlyizátumban, ami alacsony szintű fehérjeszintézisre vagy akár az mRNS hiányára is utalhat. A p.Asn450Ile

mutáns esetében a Western blot egy csökkent (körülbelül 56 kDa) molekula tömegű AT fehérjét mutat. A második csoport (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Gly456delins_Ala_Thr) magas AT fehérje expressziót mutat a sejtlizátumban de alacsony AT fehérje expressziót a felülúszóban, ezzel szekréción zavarra utalva. A harmadik csoport (p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr) azokat foglalja magába, ahol az AT fehérje erős sávként jelenik meg mind a sejtlizátumban mind a felülúszóban. Ezek a mutánsok lehet, hogy funkcionális variánsok vagy az AT szerkezetére és funkciójára csak csekélyebb hatással bírnak. Hat mutáció esetében (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, és a p.Pro461Thr) stabil transzfekciót is végeztünk annak érdekében, hogy nagyobb fehérje hozamot érjünk el a további vizsgálatokhoz. A stabil transzfekció minőségének ellenőrzésére Western blot technikát alkalmaztunk és detektáltuk a vad típusú és a hat mutáns AT fehérjét a sejtek felülúszójából (10. ábra B része). A vad típusú AT és a hat mutáns AT fehérje sávja a tranziens transzfekció eredményével megegyező módon jelent meg.

5.2.5 Valós idejű kvantitatív PCR analízis eredménye

RT-qPCR vizsgálatot végeztünk a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek AT mRNS expressziójának meghatározására három független transzfekcióból. A transzfekció hatékonyságának ellenőrzésére a béta-galaktoszidáz mRNS expresszióját mértük. Az RNS mennyiségének meghatározására a „comparative threshold cycle” (CT) módszert alkalmaztuk, a vizsgált gén CT értékeit az OAZ housekeeping génre normalizáltuk. A variánsok mRNS tartalmát a vad típus értékének arányában adtuk meg a következőképpen: p.Arg14Lys $1,09 \pm 0,03$ p.Cys32Tyr $1,03 \pm 0,04$ p.Arg78Gly $1,03 \pm 0,04$ p.Met121Arg $1,00 \pm 0,03$ p.Leu245Pro $1,01 \pm 0,01$ p.Leu270Argfs*13 $0,99 \pm 0,07$ p.Asn450Ile $0,94 \pm 0,04$ p.Gly456delins_Ala_Thr $0,96 \pm 0,05$ and p.Pro461Thr $0,98 \pm 0,03$. (Az értékek relative quantification (RQ) \pm SEM-ben vannak megadva az egyes transzkriptumokra az OAZ génre normalizálva. Az RT-qPCR alapján az AT mRNS expressziós szintje a kilenc mutáns esetén nem volt szignifikánsan különböző a vad típuséhoz képest. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a csökkent AT fehérje mennyiség hátterében, még akkor is ha az a sejtlizátumban is csökkent, nem a mRNS csökkent mennyisége áll. Így a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutációk esetében, melyeknél nagyon kevés AT fehérjét detektáltunk a sejtlizátumokban, vagy egyáltalán nem detektáltunk a lizátumban AT-t, inkább a fehérje szintézis rendellenessége valószínű.

5.2.6 Antithrombin antigén szintek a HEK-293 sejtekben expresszáltatott vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék esetében

A vad típusú és a mutáns AT antigén szintek ELISA módszerrel voltak meghatározva duplikátumban a különböző transzfekciós kísérletekből. A 11. ábrán mutatjuk be az AT antigén koncentrációkat a vad típusúhoz hasonlítva, amit 100%-nak fogtunk fel. Az egyes AT antigén értékeket normalizáltuk a transzfekció hatékonyságára, mely utóbbit β -GAL mérésrel számszerűsítettünk. Az AT antigén koncentráció a sejtek felülűszójában a következőképpen alakult (zárójelben a különböző transzfekciós kísérletek száma):

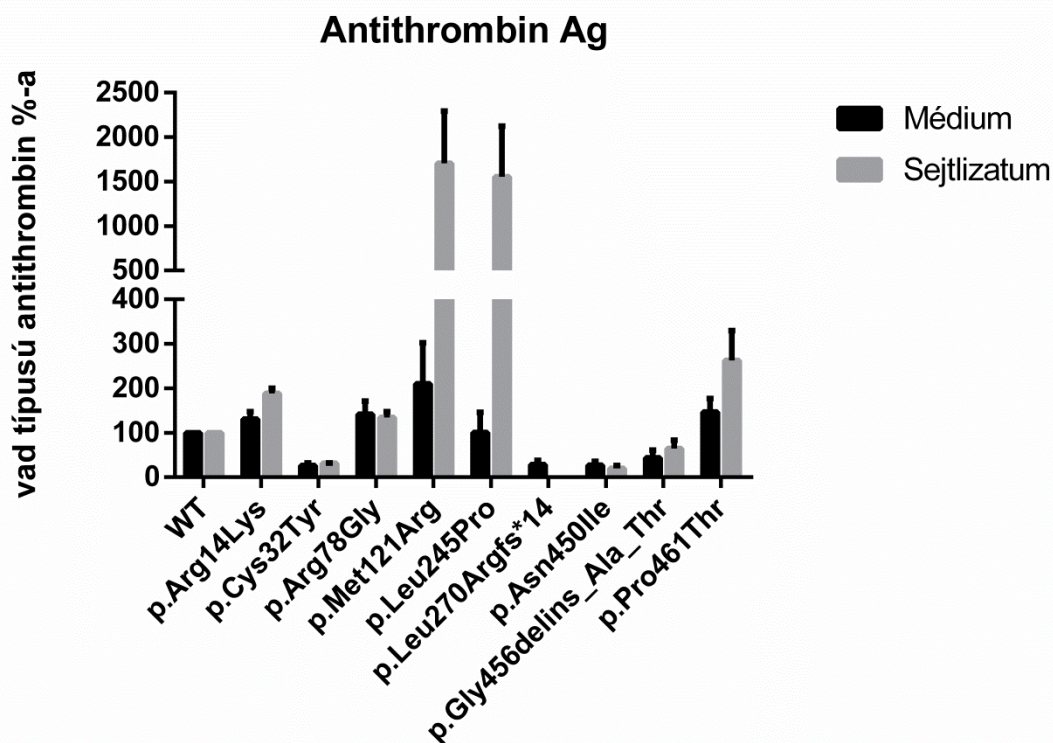
p.Met121Arg 210,00 \pm 92,11 % (n=4);
p.Pro461Thr 147,00 \pm 30,09 % (n=4);
p.Arg78Gly 141,75 \pm 29,77 % (n=4);
p.Arg14Lys 131,00 \pm 16,39 % (n=4);
p.Leu245Pro 100,75 \pm 45,55 % (n=4);
p.Gly456delins_Ala_Thr 43,66 \pm 17,42% (n=3);
p.Leu270Argfs*14 28,33 \pm 9,56 % (n=3);
p.Asn450Ile 27,00 \pm 8,50 % (n=3); és
p.Cys32Tyr 26,25 \pm 5,72 % (n=4).

Az AT antigén koncentráció értékek a sejtlizátumokban a következők voltak (zárójelben a különböző transzfekciós kísérletek száma):

p.Met121Arg 1706,25 \pm 585,45 % (n=4);
p.Leu245Pro 1555,75 \pm 568,72 % (n=4);
p.Pro461Thr 262,50 \pm 67,22 % (n=4);
p.Arg14Lys 188,25 \pm 11,69 % (n=4);
p.Arg78Gly 134,25 \pm 13,14 % (n=4);
p.Gly456delins_Ala_Thr 64,66 \pm 18,67% (n=3);
p.Cys32Tyr 31,33 \pm 0,88 % (n=3);
p.Asn450Ile 20,00 \pm 6,55 % (n=3); és
p.Leu270Argfs*14 0,00 \pm 0,00 % (n=3).

Láthatjuk, hogy az AT antigén koncentráció alacsony a p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutánsok esetében mind a sejtlizátumban, mind a felülűszóban, a Western blot analízissel kapott eredményeinkkel összhangban. A másik hat mutáns sejtlizátumában számottevő AT fehérje mennyiség volt kimutatható. Közülük az AT antigén szint nagyon magas volt a p.Met121Arg és a p.Leu245Pro mutánsok tekintetében. Az AT antigén koncentráció a felülűszókban a p.Arg14Lys, p.Arg78Gly, p.Pro461Thr csoportban a vad

típushoz volt hasonló, a p.Gly456delins_Ala_Thr esetében alacsony volt. A p.Met121Arg és p.Leu245Pro vonatkozásában a felülúszó AT antigén koncentrációja a sejtliázátumban talált mennyiséghez viszonyítva aránytalanul volt alacsony.



11. ábra: Antithrombin antigén eredmények a HEK-293 sejtekben expresszálatott különböző mutáns fehérjék esetében. A transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából és sejtliázátumából történt AT antigén mérés ELISA technikával. Tranziens transzfekció esetén az eredményeket a transzfekció határfokára normalizáltuk. Az eredmények a vad típusú AT antigén eredményének százalékában vannak megadva. A grafikonon különböző transzfekcióból származó mérések átlagát láthatjuk, a hiba sávok (error bars) a standard error of the mean-t jelentik. A fekete oszlopok a felülúszó AT koncentrációját, a szürke oszlopok a sejtliázátumok AT koncentrációját jelölik.

5.2.7 A HEK-293 sejtekben expresszálatott vad típusú és mutáns AT fehérjék AT aktivitása

Az alacsony AT antigén koncentrációjú mutánsok kivételével heparin kofaktor aktivitást (hc-antiFXa) és progresszív aktivitást (p-antiFXa) határoztunk meg a transzfektált sejtek felülúszójából legalább két független transzfekcióból spektrofotometriás mérési módszerrel (12. ábra). A mutánsok heparin kofaktor aktivitás (hc-antiFXa) és progresszív aktivitás (p-

antiFXa) eredményeit a vad típus AT aktivitásának függvényében adtuk meg. E kísérletekben is a vad típus AT aktivitás értékeit vettük 100%-nak. A heparin kofaktor aktivitás (hc-antiFXa) értékek a következők voltak:

p.Leu245Pro $110,00 \pm 25,07$ %;

p.Met121Arg $106,5 \pm 26,67$ %;

p.Pro461Thr $93,75 \pm 44,67$ %;

p.Arg14Lys $85,16 \pm 18,99$ %; és

p.Arg78Gly $61,50 \pm 8,50$ %.

A progresszív aktivitás (p-antiFXa) értékek pedig a következőképpen alakultak:

p.Pro461Thr $160,27 \pm 67,06$ %;

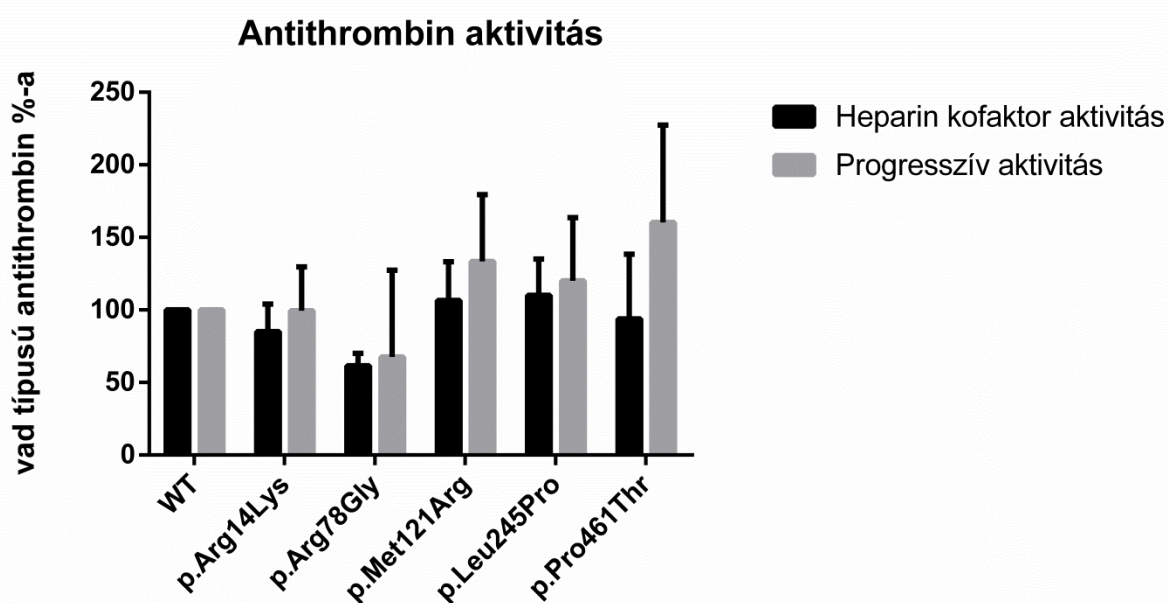
p.Met121Arg $133,46 \pm 46,10$ %;

p.Leu245Pro $120,14 \pm 43,47$ % ;

p.Arg14Lys $99,56 \pm 30,07$ %; és

p.Arg78Gly $67,54 \pm 59,85$ %.

A p.Arg14Lys, p.Met121Arg, és p.Leu245Pro mutánsok esetében az AT aktivitás nem mutatott csökkenést a heparin kofaktor és a progresszív mérésekben, és a két mérés arányos eredményeket adott. A p.Arg78Gly mutánst illetően az AT heparin kofaktor aktivitás csak a 60%-a volt a vad típusénak, és a progresszív AT aktivitás eredmények nagy szórást mutattak, csökkent és normál értékeket is mértünk a különböző kísérletekben. A p.Pro461Thr vonatkozásában nagy különbséget mutattunk ki a hc-antiFXa és a p-antiFXa között.



12. ábra: HEK-293 sejtekben expresszált különböző mutáns AT fehérjék antithrombin aktivitása. A fekete oszlop a heparin kofaktor aktivitást (hc-antiFXa), a szürke oszlop a

progresszív aktivitást (p-antiFXa) jelenti. Az aktivitás értékek a tranziensen transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából voltak meghatározva spektrofotometriás módszerrel (LX Antithrombin Hc + P, FXa reagens).

5.2.8 A p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr mutáns antithrombin fehérjék heparin-kötő képességének jellemzése

A funkcionális mérések eredményei alapján megváltozott heparin kötést feltételeztünk a p.Arg78Gly és a p.Pro461Thr AT esetében. Ezért ezen két mutáció heparin kötő tulajdonságát, és kontrollként a vad típust, vizsgáltuk tisztított rekombináns fehérjék felhasználásával.

A kölcsönhatás kinetikus és affinitási paramétereit különböző AT koncentrációnál mért szenzorgramokból számoltuk és átlagoltuk az egyes antithrombinoknál (6. táblázat). Ahogy vártuk, a legerősebb AT-heparin kötés a vad típus esetében volt megfigyelhető ($K_D = 8.49 \times 10^{-7}$ M). Az asszociációs állandó $k_a = 2.66 \times 10^6$ 1/Ms. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az AT-heparin komplex a leggyorsabban a vad típusú AT esetében alakult ki. A p.Arg78Gly AT mutánsnál a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1.69 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1.15 \times 10^3$ 1/Ms. A p.Pro461Thr AT mutáns vonatkozásában a következő eredményeket kaptuk: $K_D = 1.61 \times 10^{-6}$ M és az asszociációs konstans $k_a = 1.38 \times 10^4$ 1/Ms.

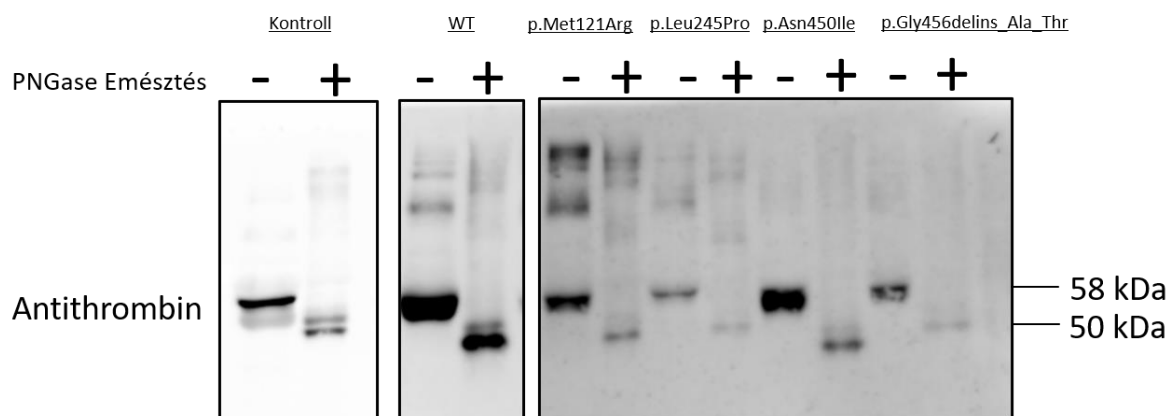
	Vad típus	p.Arg78Gly	p.Pro461Thr
K_D (M)	$8,49 \times 10^{-7}$	$1,69 \times 10^{-6}$	$1,61 \times 10^{-6}$
K_A (1/M)	$8,83 \times 10^8$	$9,41 \times 10^6$	$9,007 \times 10^6$
k_d (1/s)	$2,68 \times 10^{-3}$	$1,46 \times 10^{-3}$	$1,34 \times 10^{-3}$
k_a (1/Ms)	$2,66 \times 10^6$	$1,15 \times 10^3$	$1,38 \times 10^4$

6. táblázat: A vad típusú és a mutáns antithrombin fehérjék kölcsönhatás vizsgálata heparinnal bevont szenzor chip felületen felületi plazmon rezonancia alapú kötési technikával. A vad típusú és a mutáns AT fehérjék a transzfektált HEK-293 sejtek felülúszójából voltak affinitás kromatográfiával tisztítva. Az AT minták különböző koncentrációkban (40, 80, 120, 160, 200 és 240 nM) voltak injektálva a heparinnal bevont szenzor chip felületre. A táblázatban a különböző koncentrációjú AT-okkal kapott eredmények átlagai szerepelnek. Dr. Péntes-Daku Krisztina, Dr Bécsi Bálint eredményei

Ezen eredmények alapján elmondhatjuk, hogy az AT-heparin komplex kialakulása a mutáns fehérjék esetében a vad típusú AT-hoz képest lassabbnak látszik. Mindkét mutáns gyengébb kölcsönhatást mutatott a heparinnal, a K_a és a K_d értékeik hasonlóak voltak.

5.2.9 A mutáns AT fehérjék N-glikozidáz F emésztése

Az N-glikoziláció a fehérjék egyik döntő poszttranszlációs módosító folyamata [93]. Az N-glikozidáz F az aszparagin kötött N-glikánokat hasítja le a glikoproteinekről. Az AT négy N-glikozilációs hellyel rendelkezik (Asn128, Asn167, Asn187 és Asn224), az ezeket a helyeket érintő misszensz variánsokról és még másokról is leírták a glikoziláció gátlását [94], [95]. Azokat a mutánsokat (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr) választottuk ki az N-glikozidáz F emésztésre, melyeknél kevés AT fehérjét mutattunk ki a felülúszóban, ami utalhatott szekréción problémára, esetleg az N-glikoziláció megváltozása miatt. A sejtek felülúszójának PNGase kezelése megváltoztatta az elektroforetikus vándorlás mintázatát a vad típus és mind a négy AT fehérje variáns esetében. Ez azt bizonyítja számunkra, hogy ezek a mutáns fehérjék N-glikozilálva voltak az endoplazmatikus retikulumban. A vad típus és a négy variáns AT fehérje megegyező elektroforetikus vándorlási mintázatot mutatott. A nem emésztett AT 58 kDa molekulatömegnél volt detektálható egyetlen sávként, a PNGase emésztett AT 50 kDa molekulatömegnél volt detektálható.



13. ábra: A mutáns antithrombin fehérjék N-glikozidáz F emésztéses vizsgálata. A transzfektált sejtek felülúszójának Western blot analízise PNGase emésztés előtt és után. Az SDS-PAGE nem redukáló körülmények között volt futtatva, pozitív kontrollnak 40-szeresre hígított poolozott humán plazmát alkalmaztunk.

6. Megbeszélés

6.1 Antithrombin Budapest3, Basel és Padua mutációk vizsgálatával kapott eredmények összefoglalása

A IIHBS ATD felismerése időben visszanyúl a 80-as évekbe, amikor az irodalomban számos abnormális AT-heparin kölcsönhatásról szóló közlemény született [96], [5], [6], [7], [8]. Az AT Basel mutációról Brennan és munkatársai leírták, hogy kapcsolatba hozható artériás thrombosisal, és heparin-Sepharose affinitás kromatográfiával egy rendellenes csúcsot mutat [5]. Bebizonyították továbbá, hogy monoklonális antitest alapú heparin kötési affinitás vizsgálatban az AT Basel 40-szeres csökkenést mutat a heparin kötés affinitásában a normál AT-hoz képest [6]. Az AT Padua mutáció egy másik tanulmány szerint 30-szoros csökkenést eredményez a heparin kötésben másféle módszereket felhasználva a vizsgálatban. [7]. Az ATBp3 variáns csökkent heparin affinitást mutatott heparin-Sepharose kromatográfiával és nem frakcionált heparin jelenlétében vagy pentaszacharid kötött AT esetében az antiproteináz aktivitása csökkent volt a normál AT-hoz hasonlítva [9]. Martinez-Martinez és munkatársainak egy elegáns vizsgálat során kapott eredményei szerint az ATBp3 homozigóta betegek plazma mintáiban emelkedett volt az alacsony heparin affinitású AT frakció [8]. A legfontosabb megállapítása a tanulmányuknak a β -AT kompenzáló hatásának bemutatása volt az ATBp3 és AT Basel IIHBS típusú mutációk esetében. Ők ugyan nem vizsgálták az AT Padua mutációt, de az azonos pozícióban kialakuló, egy arginin cisztein cserével járó mutáció esetében azt tapasztalták, hogy a rekombináns β -izoforma tudta kompenzálni ennek a mutációnak a heparin kölcsönhatásra gyakorolt markáns hatását. Az összes mutánsra egységes módszereket alkalmazó direkt összehasonlító vizsgálat az ATBp3, AT Basel, és AT Padua mutációk heparin kötő tulajdonságainak tanulmányozására azonban előttünk még nem született. Mivel AT Basel és AT Padua homozigóta betegek nem léteznek, csak rekombináns tisztított rendszerből volt nyerhető nagy mennyiségű homozigóta mutáns AT variáns, ami a biokémiai vizsgálatok alapjául tudott szolgálni. Összetett *in silico* tanulmányokat sem végeztek korábban ezen IIHBS típusú mutánsok viselkedésének összehasonlítására. Hazánkban, viszonylag nagy AT deficiens beteg csoportunkban (n=449 beteg) a IIHBS típusú alcsoport a leggyakoribb. Bebizonyítottuk, hogy az ATBp3 mutáció gyakori előfordulása ebben az AT deficiens populációban alapító hatás eredménye [97]. Számos klinikai tanulmány sugall különbségeket a klinikai és laboratóriumi fenotípusokban, főként az AT-heparin kötés erősségében a IIHBS AT deficienciát okozó különböző mutációk körében [55],

[51], [98], [99]. A IIHBS típusú ATBp3, AT Padua, és AT Basel mutációk összefüggésbe hozhatók MVT-vel, ATE-vel és terhességi komplikációkkal is. Heterogenitás volt megfigyelhető a IIHBS AT deficiens betegeink laboratóriumi eredményeiben is (3. táblázat). A heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás csökkent volt. A progresszív anti-FXa AT aktivitás alacsony normál volt vagy a normál tartományban esett. Az AT antigén szintek normál tartományban voltak az AT Basel és az AT Padua betegek esetében. Azonban az ATBp3 homozigóta és heterozigóta egyének esetében az AT antigén koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt összehasonlítva azokat az AT Basel és AT Padua esetekkel. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy az ATBp3 mutáció nemcsak a heparinhoz való affinitást befolyásolja, de enyhe kvantitatív defektust is eredményez. A nanoDSF kísérleteink eredményei alapján a plazmából tisztított homozigóta ATBp3 csökkent termostabilitást mutatott a WT AT-al összehasonlításban. (Mivel homozigóta AT Basel és AT Padua plazma nem volt elérhető, ezért ez a kísérlet ezen mutánsok esetében nem volt elvégezve.) Az ATBp3 instabilitását az *in silico* vizsgálataink is megerősítették, ahol a D hélix meghosszabbodását figyeltük meg a natív formában és megnövekedett RMSF-t találtunk a nem aktivált állapotában. Ezek a változások nem látszanak ugyan végzetesnek, de vezethetnek enyhe szekréción defektushoz, vagy az ATBp3 gyorsabb eliminációját okozhatják annak instabilitása miatt. Tudomásunk szerint pulse-chase kísérleteket nem végeztek eddig a feltételezések igazolására, azonban két tanulmányban az AT génben az ATBp3 pozícióhoz közel eső mutációk csökkent szekréciónhoz vezettek [10], [100].

Ebben a tanulmányunkban az ATBp3, AT Basel és AT Padua mutánsok AT-heparin kötő tulajdonságaira fókuszáltunk és a heparin kötő affinitásuk különbségeinek hátterét szándékoztunk felderíteni. Poolozott normál humán plazmát és ATBp3 heterozigóta, ATBp3 homozigóta, AT Basel heterozigóta és AT Padua heterozigóta betegektől származó AT deficiens plazmát vizsgáltunk meg keresztezett immunoelektroforézis módszerével (4. ábra). Megállapítottuk, hogy a heparin affinitásban az ATBp3 heterozigóta és az AT Basel heterozigóta plazmák nem különböztek. Az AT Padua heterozigóta plazmát vizsgálva egy erősebb alacsony heparin affinitású frakciót figyeltünk meg, míg az ATBp3 homozigóta plazmában csak ez az alacsony heparin affinitású frakció jelent meg. Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy az AT Padua a súlyosabban érintett AT mutáns a heparin affinitás szempontjából. Amennyiben különböző IIHBS ATD betegek progresszív és heparin kofaktor aktivitását összehasonlítottuk (ld. 3 táblázat) a különböző heterozigóta IIHBS mutációkat összehasonlítva a_p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az AT Padua esetében volt a legmagasabb. Az AT Basel és AT Padua homozigóta betegek hiánya miatt ezen mutációk biokémiai következményeinek direkt összehasonlítása plazma mintákban problémás. Ezért a

további vizsgálatokhoz létrehoztunk rekombináns modelleket. A rekombináns WT AT és ATBp3, AT Basel, AT Padua fehérjét HEK-293 sejtekben expresszáltuk. A stabilan expresszált fehérjét összegyűjtöttük, koncentráltuk és affinitás kromatográfiával tisztítottuk. Ezeket a tisztított fehérjét SPR módszerrel vizsgáltuk (6. ábra). A vad típusú és a mutáns AT-ok heparin affinitását vizsgáltuk immobilizált heparin felszínen. Az SPR módszer számos előnnyel rendelkezik a molekuláris kölcsönhatásokat vizsgáló módszerek között. Jelölésmentes, valós idejű, közepes áteresztőképességű tesztet biztosít és csak kis mennyiségű anyagot és reagenst igényel. Optikai módszert használ az arany felszínhez közeli közeg törésmutató változásának a detektálására, amikor az analit molekulák a fém felszínhez kötött ligand molekulákhoz kötődnek [101]. A mai napig csak nagyon kevés számú tanulmány jelent meg, amely az AT – heparin kölcsönhatást SPR technikával vizsgálja. Azonkívül nem volt olyan irodalom, amely a IIHBS mutánsok direkt összehasonlítását mutatja be. Zhao és munkatársai egy új módszert fejlesztettek ki a heparinok antikoaguláns aktivitásának egyszerű mérésére SPR módszerrel [102]. A vizsgált heparin antikoaguláns aktivitásának meghatározására kompetitív módszert alkalmaznak, melyben az oldott fázisban lévő vizsgálandó heparin és a chip felszínén immobilizált heparin verseng az AT kötésért. Különböző állati forrásokból kinyert heparinokat és alacsony molekulásúlyú heparinokat analizáltak e módszerrel és az eredmények reprodukálhatónak bizonyultak, továbbá jól korreláltak a rutin hemosztázis laboratóriumban használt kromogén meghatározásból származó eredményekkel (korrelációs együttható $r = 0,98$ az anti-Xa és $r = 0,94$ az anti-IIa esetében). Ezt a jól kidolgozott kompetitív SPR módszert számos tanulmány alkalmazta a heparin – fehérje kölcsönhatás jellemzésére [103], [104], [105]. Korábban SPR mérést alkalmaztak már a prothrombin, thrombin, AT, és fibrinogén heparin kötő tulajdonságának vizsgálatára is [106]. Biotinált heparin, heparin-albumin konjugátum, és albumin volt kikötve a sztreptavidin-fedett szenzorra, mint ligandok. Az AT kötődési mintázata heparinhoz és heparin-albumin konjugáthoz, bár specifikus volt, de bifázisos, valószínűleg a kötési folyamat alatt lejátszódó konformációváltozás miatt. Az egyensúlyi állapot kinetikájának vizsgálata során K_D érték $281 \pm 24 \times 10^{-9}$ M volt a heparin felületre. A konjugát felületre a K_D értéke $53 \pm 5 \times 10^{-9}$ M-nak adódott, ami nagyobb affinitást jelent a heparin-albumin konjugát irányába. (A cikkben említett további fehérjék eredményeire itt most nem térünk ki.) Ezen értékeket összehasonlítva a mi eredményeinkkel, megállapíthatjuk, hogy ezek a K_D értékek a mi vad típusú rekombináns AT fehérjénk K_D értékéhez közel vannak ($K_D = 6,4 \times 10^{-10}$ M). Kísérleteinkben az AT Paduának volt a legkisebb heparin affinitása ($K_D = 1,08 \times 10^{-6}$ M) és az ATBp3 mutáns K_D értéke ($K_D = 2,15 \times 10^{-8}$ M) volt a legközelebb a vad típusú AT-hoz, azonban még így is két nagyságrend különbség van köztük. Az AT Basel heparin affinitása a

kettő között volt ($K_D = 7,64 \times 10^{-7} \text{ M}$). A WT AT és a mutáns AT fehérjék biokémiai vizsgálataiban kapott különbségeket az *in silico* analízis eszközével szándékoztuk megmagyarázni. Az AT Basel variáns ligandum nélküli szimulációjában a 22-46 hurok új konformációját figyeltük meg, amely valószínűleg interferál a pentaszacharid kötéssel (7. ábra). A vizsgált variánsok közül az AT Basel mutáció érintette a legkevésbé a fluktuációkat és az allosztérikus útvonalakat a vad típussal összehasonlítva, ezért nem valószínű, hogy ennek a mutációnak erős destabilizáló hatása lenne a másodlagos és harmadlagos szerkezetre. Az ATBp3 variáns vonatkozásában növekedett fluktuációt figyeltünk meg a fehérjében a heparin kötő helyhez közel és még távolabbi régiókban is. A „generalizált korreláció” számításokból, azt a következtetést tudtuk levonni, hogy ez a variáns valószínűleg azokat az allosztérikus útvonalakat érinti, melyek az AT konformációs aktivációjában játszanak szerepet. A szimulációink alapján az AT Padua variánsnak van a legsúlyosabb következménye. Az RMSF módszerrel mért α -szén atomok fluktuációja szignifikánsan emelkedett volt a normál AT-hoz hasonlítva mind nem-aktivált és aktivált állapotban. A „generalizált korreláció” számítások alapján az allosztérikus útvonalak is érintettek. Úgy tűnik, hogy ennek a variánsnak a heparin kötési defektusán kívül még destabilizáló hatásai is vannak. Szignifikáns disszociációja a pentaszacharidnak egyik AT-pentaszacharid komplex szimulációban sem volt megfigyelhető. A szimulációs trajektóriákból csak minőségi következtetéseket tudunk levonni a WT és a mutáns AT pentaszacharid kötésével kapcsolatban, hiszen a részben, vagy teljesen disszociált konformációkból elégtelen mintavételezést tudunk csak kivitelezni, így szabad energiákat sem tudunk számítani. Ezen számítások elvégzéséhez más, „javított” mintavételezési technika szükséges, például a nemrég publikált LiGaMD módszer [107].

Több okból is nehéz lefordítani a tisztított rendszer biokémiai vizsgálatainak eredményét és az *in silico* analízis megfigyeléseit direkt módon a klinikai következményekre. Először azért mert az *in vitro* tanulmányok rekombináns tisztított homozigóta AT variánsokat használtak, míg a betegek a különböző mutációval (kivéve az ATBp3 homozigótákat) heterozigóták voltak, így a klinikai fenotípusukat egyértelműen befolyásolta a normál alléljukról expresszálandó AT. Az α -AT és β -AT arányok is változóak betegről betegre befolyásolva ezzel a heparin kötő affinitást. Másodsor, mivel a thrombosis egy általános komplex betegség az AT deficienciából adódó kockázat módosulhat más genetikai vagy környezeti faktorok miatt, ami szintén eltérő a betegek között. Ráadásul lehetnek védő faktorok is (nem teljesen tisztázott még most, melyek ezek), amik módosítják a klinikai kép súlyosságát AT deficienciában gén – gén vagy gén-környezet kölcsönhatásokon keresztül.

Módszerek	Vad típus	AT Basel	AT Padua	ATBp3
Keresztezett Immunoelektroforézis	Normál	alacsony heparin affinitású csúcs	legmarkánsabb alacsony heparin affinitású csúcs	alacsony heparin affinitású csúcs
NanoDSF	Normál	-	-	csökkent termostabilitás
SPR	$K_D 6,40 \times 10^{-10}$	$K_D 7,64 \times 10^{-7}$	$K_D 1,08 \times 10^{-6}$	$K_D 2,15 \times 10^{-8}$
AT fehérje in silico vizsgálata	Normál	Interferencia pentaszacharid kötődéssel	Az AT konformációs aktivációjának markáns eltérése (allosztérikus út) Markánsabb destabilizáló hatás	Az AT konformációs aktivációjának eltérése (allosztérikus út) Destabilizáló hatás

7.táblázat: Antithrombin Budapest3, Basel és Padua mutációk vizsgálatával kapott eredmények táblázatos összefoglalása

6.2 A kilenc új antithrombin mutáció biokémiai következményeinek összefoglalása

Kilenc új AT mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) klinikai és molekuláris karakterizálását végeztük el. Indirekt és direkt bizonyítékokat gyűjtöttünk, hogy meghatározzuk patogenitásuk mértékét, és hogy ATD alcsoportokba csoportosítsuk őket. A misszensz variánsok közül a p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Asn450Ile, és a p.Pro461Thr mutációkat mind a hat (PolyPhen2 HumDiv, PolyPhen2 HumVar, MutPred2, PhD-SNP, SIFT és MutationTaster) in silico módszerrel vizsgálva patogénnek találtuk, és az AT szekvencia homológia vizsgálata is alátámasztotta az ártalmas hatásukat. Két misszensz mutáció, a p.Arg14Lys és a p.Cys32Tyr, az AT szekvencia szignál peptid részén van. Két in silico módszer patogénnek jósolta ezeket a mutációkat, míg két másik módszer semlegesnek. A szekvencia homológia vizsgálat is összhangban volt ezzel, mivel az AT szignál peptid szekvencia heterogén volt a vizsgált hét fajban. A p.Arg78Gly mutáns in silico predikciója eléggé ellentmondásos volt (három módszer sorolta nem patogén mutációnak), azonban a homológia vizsgálat erősen konzervált pozíciót jelzett a mutációra. A p.Arg14Lys mutációt

hordozó beteg plazma mintájában csökkent heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitás és csökkent progresszív anti-FXa AT aktivitás volt mérhető. Az AT antigén koncentráció is csökkent volt, ami inkább kvantitatív ATD-re utal. Azonban a rekombináns p.Arg14Lys AT mennyisége nem volt szignifikánsan alacsonyabb, mint a WT AT fehérje (a Western blot, az AT antigén és aktivitás eredmények alapján). Ezek és a variáns pozíciója (a szignál peptid N-terminális régiójának pozitívan töltött bázikus részét érinti, amely nagyon semleges rész) nem erősítik meg kétségtelenül a mutáció patogén voltát, és azt sugallják, hogy az index beteg MVT-jének és alacsony AT szintjének háttérében egyéb okozati tényező is állhatott. Corral és munkatársai azt javasolják, hogy abban az esetben ha a *SERPINC1* génben nem találunk okozati mutációt, akkor a következő gének befolyásolhatják a plazma AT szintjét: az AT gén transzkripció kontrolljában vagy poszttranszlációs módosításában részt vevő gének mutációi, vagy az AT eltávolításában részt vevő fehérjék génjei [15]. Az is elképzelhető, hogy a p.Arg14Lys mutációhoz kapcsolódik egy másik mutáció a *SERPINC1* gén távoli promoter vagy introni régiójában, amit nem detektáltunk a Sanger szekvenálással, és együtt okozzák az alacsony AT szintet. Sajnos nem tudtunk kiterjesztett családvizsgálatot végrehajtani a variáns és az okozott betegség kapcsolatának további elemzésére. A p.Cys32Tyr mutáció a betegben alacsony heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitást és alacsony progresszív anti-FXa AT aktivitást okozott és az AT antigén szintje is arányosan csökkent volt. A rekombináns p.Cys32Tyr fehérje Western blot analízise nagyon alacsony AT expressziót mutatott ki mind a felülúszóban és a sejtlyátumban, melyet az AT antigén mérés is megerősített. Normál mRNS szintet mutattunk ki RT-qPCR módszerrel, mely transzlációs vagy poszttranszlációs defektet valószínűsít. A p.Cys32Tyr mutáció a szignál peptid konzervált poláris C-terminális régiójában van, mely a hasító helyet tartalmazza. Az *in silico* analízis felvetette egy abnormalis hasító hely létrejöttét a 32-es pozíció után. A szignál peptid fontos szerepet játszik a riboszómák általi transzláció folyamatában, a keletkező fehérje a szignál peptiden keresztül köt a szignál felismerő részecskéhez, amely a komplexet az endoplazmatikus retikulumba irányítja [108]. Ezért bizonyos pozíciók a szignál peptidben kiemelkedően fontosak a szignál peptid funkció szempontjából. Jochmans és munkatársai leírtak egy variánst I-es típusú ATD betegben, ahol a cisztein argininre változott ebben a pozícióban, és patogénnek találták [109]. Az *in silico* és biokémiai vizsgálataink alapján a p.Cys32Tyr mutációt káros variánsnak tudtuk minősíteni, amely I-es típusú ATD-hez vezet. A p.Arg78Gly mutáció az AT heparin kötő helyét érinti. A beteg heparin-kofaktor-anti-FXa AT aktivitása alacsony volt, míg a progresszív anti-FXa AT aktivitása és az AT antigén szintje normál tartományba esett, ami II-es típusú HBS ATD-át véleményez. A rekombináns p.Arg78Gly mutáns Western blot analízise és az AT antigén mérés nem mutatott eltérést, azonban a heparin-kofaktor-anti-FXa

AT aktivitás aránytalanul alacsony volt. Az SPR mérések megerősítették a megváltozott heparin – AT kölcsönhatást. Bravo-Pérez és munkatársai leírtak egy variánst azonos pozícióban, a p.Arg78Gln mutációt, amely az alacsony heparin affinitású AT forma mennyiségének a megnövekedéséhez vezetett a plazmában. Ők ezt a variánst II-es típusú HBS deficienciának sorolták be, ami egyező a mi eredményeinkkel [110]. A p.Met121Arg mutáció hatására a betegben a heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Met121Arg AT fehérje Western blot vizsgálata szekréciós zavarra utalt, mivel a sejtlyúzátumban magas AT fehérje expressziót de a felülúszóban alacsonyat detektáltunk. Ezzel megegyezően az AT antigén szint nagyon magas volt a sejtlyúzátumban és alacsony volt a médiumban a sejtlyúzátum AT szintjéhez hasonlítva. Megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típussal normál glikozilációt jelezve az ER-ban. Egy feltételezett magyarázat a sejtlyúzátumok nagyon magas AT antigén szintjére az unfolded protein response (UPR) jelensége. Az abnormális fehérjék felhalmozódnak az ER-ban és az ER stressz csökkentésére aktiválódik ez a mechanizmus. Amikor az UPR kapacitása a fehérje-egyensúly fenntartására kimerül, a sejtek belépnek az általános apoptózis útvonalra [111], [112]. Az irodalomban két másik mutációt is találtunk ebben a pozícióban, p.Met121Ile [55], és a p.Met121Lys [113], azonban ezekben az esetekben expressziós tanulmányok nem születtek. A kísérletes eredményeink alátámasztják a p.Met121Arg mutáció patogén természetét. A p.Leu245Pro mutáció hordozója egy férfi beteg, aki proximális MVT-t szenvedett el. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyak voltak, I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Leu245Pro fehérje Western blot analízise szekréciós zavarra engedett következtetni, mivel magas AT fehérje expressziót detektáltunk a sejtlyúzátumokban de alacsonyat a médiumban. Ezzel megegyezően az AT antigén szint nagyon magas volt a sejtlyúzátumban és alacsony volt a médiumban a sejtlyúzátum AT szintjéhez hasonlítva. Megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típussal normál glikozilációt jelezve az ER-ban. Az irodalomban megtaláltuk az AT Murcia (p.Lys241Glu) mutációt, mint egy szomszédos variánst [114]. Bizonyos misszensz mutációk I-es típusú ATD-t tudnak okozni a protein foldingot érintő hatásukkal, azáltal, hogy a rosszul feltekeredett fehérjék lebomlanak a lizoszómákban vagy felgyülemlenek az ER belsejében [115], [116]. Ezen mutáció esetében, a p.Met121Arg mutációhoz való hasonlósága miatt, feltételezzük az UPR mechanizmust, amely a ATD I-es típusú fenotípus oka. A p.Leu270Argfs*14 mutációt egy férfi betegnél diagnosztizáltuk, aki ötször szenvedett el MVT-t. Klinikai nézőpontból tekintve ez az eset mutatta a legsúlyosabb thromboticus

fenotípust. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitás és az AT antigén értékek arányosan alacsonyok voltak, így I-es típusú ATD-re utaltak. A rekombináns p.Leu270Argfs*14 fehérje Western blot vizsgálata és az AT antigén mérés alacsony AT szinteket tárt fel mind a felülúszó és a sejtlyázátum mintákban. Az RT-qPCR mérés normál RNS szintet mutatott, amely translációs problémára hívta fel a figyelmet. A 270-es pozíció után egy stop szekvencia jön létre, ami a transláció korai terminálását okozza. A p.Asn450Ile mutáció hordozója egy család. A heparin-kofaktor-anti-FXa, a progresszív anti-FXa AT aktivitásuk és az AT antigén eredményeik arányosan alacsonyok voltak, I-es típusú ATD-t jeleztek. A rekombináns p.Asn450Ile fehérje Western blot analízise alacsony AT expressziót mutatott ki mind a médiumban mind a sejtlyázátumban. Kimutattunk egy abnormális AT fehérjét gyorsabb elektroforetikus mobilitással az SDS-PAGE gélen, ami sérült poszttranszlációs módosítást sugall [15]. Ezért megvizsgáltuk az N-kapcsolt glikozilációt N-glikozidáz F emésztéssel, ami megegyező volt a vad típusal, normál glikozilációt jelezve az ER-ban. Azonban más poszttranszlációs mechanizmusok defektusai is felelősek lehetnek a kifejlődött I-es típusú ATD-ért. A p.Gly456delins_Ala-Thr mutáció (egy aminosavval hosszabb fehérje képződik) a betegben arányosan alacsony heparin-kofaktor-anti-FXa, progresszív anti-FXa AT aktivitás és AT antigén értékekben nyilvánult meg, az I-es típusú ATD-nek megfelelően. A rekombináns p.Gly456delins_Ala-Thr fehérje Western blot vizsgálata magas AT expressziót mutatott a sejtlyázátumban de alacsonyat a felülúszóban. Ezek az eredmények szekréción zavarra utalnak, de nem a sérült N-kapcsolt glikoziláció miatt. Jochmans és munkatársai leírtak egy glicin arginin cserével járó szekvencia változást a 456-os pozícióban (p.Gly456Arg), amit patogénnek találtak [117], [118]. A p.Pro461Thr mutációt három nem rokon betegnél is kimutattunk. A heparin-kofaktor-anti-FXa és a progresszív anti-FXa AT aktivitás értékek aránytalanul alacsonyok voltak az AT antigén értékekhez képest, ezzel inkább funkcionális ATD-re utalva. A rekombináns p.Pro461Thr fehérje Western blot analízise és az AT antigén meghatározás magas AT fehérje szinteket mutatott a médiumban és a sejtlyázátumban is. A heparin kofaktor aktivitás csökkent volt a progresszív aktivitáshoz képest. Az SPR mérések alátámasztották a módosult heparin – AT kölcsönhatást, ami IIPE variánsra utal. Az eredményeinket megerősíti az irodalomban talált p.Pro461Leu mutáció, amit IIPE típusúnak csoportosítottak a szerzők [119], [9], [120], és a p.Pro461Ser mutáció, amit szintén IIPE típusba soroltak [121]. Új mutációk esetében azok patogenitásának igazolása vagy megcáfolása nagyon fontos a beteg további gondozása szempontjából. Továbbá a mutációk és következményeik összegyűjtése adatbázisokba, segíti a további betegek diagnosztikáját is. Mivel az ATD laboratóriumi kivizsgálásának vannak limitáló tényezői, és a beteg plazma mintájában mért AT aktivitás gyakran nem felel meg a klinikai

fenotípusnak, fontos felmérni az új mutációk hatását az AT szerkezetére és funkciójára *in vitro* kísérletekkel. Tanulmányunkban súlyos I-es típusú ATD-t igazoltunk a következő mutációkban: p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, és p.Asn450Ile (megváltozott szintézis) és a p.Met121Arg, p.Leu245Pro és a p.Gly456delins_Ala_Thr (megváltozott szekréció). Ezek a betegek legalább egy thrombosit elszenvedtek, sőt a legtöbb esetben több thrombosit is regisztráltunk. A IIHBS ATD típusú (p.Arg78Gly) esetében, ami kevésbé súlyosnak tűnt, a beteg nem szenvedett el thrombosit és az ATD diagnózisa egy alapos laboratóriumi kivizsgálás részeként lett megállapítva *in vitro* fertilizáció előtti vizsgálatok részeként. E beteg a diagnózist követően LMWH kezelést kapott a terhessége alatt, de hosszútávú antikoagulációt nem vezettek be nála szülés után, jelenleg is tünetmentes. A p.Pro461Thr mutációnak pleiotrop hatása van az AT-ra, klinikai súlyossága számottevő, az összes ezt a mutációt hordozó beteg szenvedett el thrombosit. Azonban vagy provokáló tényezőt fedeztünk fel a háttérben vagy a beteg idősebb volt a thrombosis idején. Végül a p.Arg14Lys patogenitásának szerepe kérdéses a vizsgálataink alapján. Az egyik ezt a variánst hordozó beteg tünetmentes, a másik egy thrombosit szenvedett el. Nem tudjuk kizárni egy fő (nem regisztrált) provokáló faktor jelenlétét a thrombosisának háttérben vagy hogy az alacsony AT szintet egy másik, a családjában eddig még nem azonosított genetikai defektus okozza. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy különböző *SERPINC1* mutációk patogenitásának természetét tártuk fel *in vitro* expressziós vizsgálatokkal és *in silico* analízissel, melyek különféle mechanizmusokat vetnek fel a patogenitás okaként.

mutáció	Beteg(ek)	Plazma AT szintek (h_akt/p_akt/ag)	WB Lizátum/médium	AT ag lizátum/médium	AT akt hc/p	In silico	egyéb	Patogenitás
p.Arg14Lys	1DVT/neg	↓/↓/↓	N/N	N/N	N/N	2/7	Semleges,SP régió	LB
p.Cys32Tyr	2 DVT	↓/↓/↓	↓/↓	↓/↓	-	3/7	kritikus, SP régió	P (type I), szekréció zavar
p.Arg78Gly	neg	↓/N/N	N/N	N/N	↓/N	2/7	HBS régió, abnormál SPR	LP (IIHBS)
p.Met121Arg	1 DVT	↓/↓/↓	N/↓	↑/↓	N/N	7/7	Norm N-gl	P (type I), UPR
p.Leu245Pro	1 DVT	↓/↓/↓	N/↓	↑/↓	N/N	7/7	Norm N-gl	P (type I), UPR
p.Leu270Argfs*14	5 DVT	↓/↓/↓	↓/↓	↓/↓	-	7/7	Norm mRNS	P (type I), transzl.def.
p.Asn450Ile	neg/1DVT/2DVT/neg	↓/↓/↓	↓/↓	↓/↓	-	7/7	Abnorm mobilitás, norm N-gl	P (type I), poszt-transzl. def?
p.Asn465delins	2 DVT	↓/↓/↓	N/↓	N/↓	-	-	Norm N-gl	P (type I), szek. def.
p.Pro461Thr	3 pts. DVT	↓/↓/↓	N/N	N/N	↓/N	7/7	Abnormál SPR	P (IIPE)

8.táblázat: Kilenc új antithrombin mutáció biokémiai következményeinek táblázatos összefoglalása

DVT: mély vénás thrombosis; neg: negatív; pts: betegek; AT: antithrombin; h_akt: heparin kofaktor anti-Xa aktivitás; p_akt: progresszív anti-FXa aktivitás; ag: antigén; WB:Western blot; AT akt hc/p: az antithrombin heparin kofaktor anti-Xa aktivitásának és progresszív anti-FXa aktivitásának aránya; N: normál; In silico: a patogenitást jelző in silico módszerek száma/ összes in silico módszer; SP: szignál peptid; HBS: heparin kötő hely; N-gl: N-glikozidáz emésztés eredménye; SPR: felszíni plazmon rezonancia módszer; LB: valószínűleg benignus; P: patogén; LP: valószínűleg patogén; UPR: unfolded protein response; PE:pleiotrop effektus

7. A jelölt saját eredményei, új megállapításai

1, Az ATBp3, AT Basel, és az AT Padua mutációk összehasonlító elemzésével számottevő különbségeket mutattunk ki azok heparinnal való kölcsönhatásának vonatkozásában, melyek a következő új megállapításokhoz vezettek:

- Az ATBp3 esetében a leggyorsabb és a legerősebb az AT-heparin-komplex kialakulása, így a mutánsok közül e variáns rendelkezik a legenyhébb hatással, azonban megváltozott allosztérikus aktiválást és a molekula több régiójának megnövekedett fluktuációját mutattuk ki, amely a variáns destabilizáló hatását veti fel, így a heparin kötés rendellenessége mellett e mutáns esetében kvantitatív komponens is felvetettünk.
- Az AT Basel az előző mutánsnál lassabban kötődik a heparinhoz, feltehetően a fehérje 22 – 46 aminosavak által alkotott hurokban bekövetkezett konformációs változás miatt, de a kialakult AT Basel-heparin komplex viszonylag stabil.
- Az AT Padua mutáns esetében mutattuk ki a leglassabb AT-heparin komplex kialakulást és a leggyengébb kölcsönhatást a heparinnal, az *in silico* elemzések a legjelentősebb konformációs változásokat detektálták, így e variánst tartjuk a legsúlyosabbnak.

2, Kilenc új *SERPINC1* mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr és p.Pro461Thr) részletes biokémiai vizsgálatával bemutattuk azok molekuláris következményeit és direkt bizonyítékokat szolgáltatunk azok patogenitására vonatkozóan. E bizonyítékok birtokában az egyes mutációk kategorizálását segítettük a szakmai adatbázisok számára. Részleteiben:

- A szignálpeptidet érintő p.Arg14Lys mutáció patogén szerepe nem igazolódott, felvetettük más genetikai/epigenetikai tényezők szerepét az e mutációt hordozó betegek alacsony AT szintjeinek hátterében.

- A másik, szintén a szignál peptidet érintő p.Cys32Tyr mutációról bebizonyítottuk, hogy hatására a szignál peptid hasítási helye megváltozik, ennek következtében alig szintetizálódik AT fehérje. I-es típusú ATD-nek soroltuk be.
- A p.Arg78Gly mutáció az AT heparin kötő helyét érinti, kísérleteinkkel megerősítettük a megváltozott heparin – AT kölcsönhatást és a mutánst IIHBS típusba soroltuk be.
- A p.Met121Arg és a p.Leu245Pro mutációk a biokémiai vizsgálatok eredményei alapján szekréciós zavar miatt kialakuló I-es típusú ATD-t okoznak. A szekréciós zavar háttérében feltételezzük az unfolded protein response (UPR) jelenségét.
- A p.Leu270Argfs*14, és a p.Asn450Ile mutációk I-es típusú ATD-t okoznak a protein szintézis zavara miatt. Az első esetben ennek oka a 270-es pozícióban egy stop szekvencia létrejötte, ami a transzláció korai terminálását okozza. A második esetben poszttranszlációs módosulást feltételeztünk.
- A p.Gly456delins_Ala-Thr mutáció (egy aminosavval hosszabb fehérje képződik) I-es típusú ATD-t okoz. A biokémiai vizsgálatokkal szekréciós zavart mutattunk ki a betegség háttérében.
- A p.Pro461Thr mutáció IIPE fenotípushoz vezet, módosult heparin – AT kölcsönhatást igazoltunk.

8. Összefoglalás

Munkánk során három már ismert AT mutáció (ATBp3, AT Basel, AT Padua) karakterizálását és kilenc új AT mutáció (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) részletes biokémiai és *in silico* elemzését, patogenitásuk igazolását végeztük el. Az eredményeink alapján a IIHBS típusú mutációk módosult AT-heparin kölcsönhatásának hátterében különböző molekuláris mechanizmusok állhatnak. A p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás aránya az AT Bp3 homozigótáknál a legmagasabb, ami azt bizonyítja, hogy e betegcsoportban legkórosabb az AT-heparin kölcsönhatásra. Ha azonban csak a heterozigóta betegek p-anti-FXa és a hc-anti-FXa AT aktivitás arányát vetjük össze, az AT Padua mutációt hordozók értéke a legmagasabb. Kísérleteink eredménye ezzel összhangban áll, az AT Padua mutációnak van a legerősebb hatása az antithrombinon. Ez esetben figyeltük meg a leglassabb AT-heparin komplex kialakulást és a leggyengébb kölcsönhatást a heparinnal. A keresztezett immunoelektroforézis vizsgálatban az AT Padua mutatott a normál frakcióhoz képest nagyobb alacsony-affinitású frakciót. A molekula modellező tanulmányok megerősítik ezeket az eredményeket, mivel az AT Padua konformációs változásokat mutatott az AT N-terminális 30 – 35 régiójában és nagyon megnövekedett fluktuációkat az RMSF analízisben, sugallván, hogy a mutáció érinti mind a konformációt és az allosztériát távoli részein az AT Padua molekulának. Az AT Basel sokkal lassabban köt a heparinhoz, mint más mutánsok feltehetően a 22 – 46 hurokban bekövetkezett konformációs változás miatt. Amint az AT-heparin komplex kialakult, az allosztérikus aktivitása e mutánsnak, valamint az AT Basel – heparin komplex stabilitása valószínűleg csak kis mértékben érintett. Az ATBp3 mutatta a leggyorsabb és legerősebb AT-heparin komplex kialakulást az SPR vizsgálatokban. Azonban az allosztérikus aktiválása az ATBp3-nak érintett, azonfelül a molekula több régiójának a megnövekedett fluktuációja felveti ennek a variánsnak a destabilizáló hatását. Ezek együttvéve a humán plazmából izolált homozigóta ATBp3 csökkent termostabilitásával, felvetik ennek a mutációnak a patogenitásában egy mennyiségi komponens jelenlétét is.

A kilenc új mutáns (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) esetében *in vitro* expressziós kísérletekkel és *in silico* analízissel bizonyítottunk különböző mechanizmusokat a patogenitás hátterében. Három mutáns esetében (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile) a protein szintézis zavara, másik három esetben (p.Met121Arg, p.Leu245Pro,

p.Gly456delins_Ala_Thr) szekréciós zavar okoz I-es típusú ATD-t. A p.Arg78Gly mutáció IIHBS, míg a p.Pro461Thr IPE típusba sorolható, a szignálpeptidet érintő p.Arg14Lys mutáció patogén szerepe nem igazolódott.

9. Summary

In this study we examined three, already known, IIHBS type AT mutations (ATBp3, AT Basel, AT Padua) and investigated nine novel AT mutations (p.Arg14Lys, p.Cys32Tyr, p.Arg78Gly, p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Leu270Argfs*14, p.Asn450Ile, p.Gly456delins_Ala_Thr, p.Pro461Thr) that have not been reported before.

According to our results there may be different molecular mechanisms in the background of altered AT-heparin interaction in case of type IIHBS AT mutations. AT Padua mutation has the strongest effect on AT. We observed the slowest AT-heparin complex formation and the weakest interaction with heparin. AT Padua also exerted a larger low-affinity fraction than normal fraction in CIE experiments. Molecular modeling studies well explain these findings, as AT Padua showed conformational changes in the N-terminal 30-35 region of AT and highly increased fluctuations in RMSF analysis suggesting that the mutation affects both the conformation and the allostery of distant parts of AT Padua molecule. AT Basel binds to heparin more slowly, than other mutants maybe because of the conformational change in the 22-46 loop. Once AT-heparin complex is formed the allosteric activation of AT Basel and the stability of AT Basel-heparin complex might be only slightly affected. ATBp3 showed the fastest and strongest AT-heparin complex formation in SPR studies, however the allosteric activation of ATBp3 is affected, moreover the increased fluctuation in multiple regions of the molecule suggested that this variant has a destabilizing effect. These findings together with the decreased thermostability of homozygous ATBp3 isolated from human plasma suggest the presence of a quantitative component in the pathogenicity of this mutation.

Type I ATD caused by altered protein synthesis (p.Cys32Tyr, p.Leu270Argfs*X14, p.Asn450Ile) or secretion disorder (p.Met121Arg, p.Leu245Pro, p.Gly456delins_Ala_Thr) was proved in six mutants, while type II heparin binding site ATD (p.Arg78Gly) and pleiotropic effect ATD (p.Pro461Thr) were suggested in two mutants. Finally, the pathogenic role of p.Arg14Lys was equivocal. We provided evidence to understand the pathogenic nature of novel SERPINC1 mutations by in vitro expression studies.

10. Irodalomjegyzék

1. Muszbek, L.; Berezky, Z.; Kovács, B.; Komáromi, I., Antithrombin deficiency and its laboratory diagnosis. *Clin Chem Lab Med* **2010**, 48 Suppl 1, S67-78.
2. Egeberg, O., Inherited Antithrombin Deficiency Causing Thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* **1965**, 13, 516-30.
3. Sas, G.; Blasko, G.; Banhegyi, D.; Jako, J.; Palos, L. A., Abnormal antithrombin III (antithrombin III "Budapest") as a cause of a familial thrombophilia. *Thromb Diath Haemorrh* **1974**, 32, (1), 105-15.
4. Patnaik, M. M.; Moll, S., Inherited antithrombin deficiency: a review. *Haemophilia* **2008**, 14, (6), 1229-39.
5. Brennan, S. O.; Borg, J. Y.; Shaw, G. J.; Caen, J.; George, P. M., Functional antithrombin-III variant (41 Pro---Leu) identified by liquid secondary ion mass spectrometry. *Pathology* **1991**, 23, (1), 1-4.
6. Chowdhury, V.; Mille, B.; Olds, R. J.; Lane, D. A.; Watton, J.; Barrowcliffe, T. W.; Pabinger, I.; Woodcock, B. E.; Thein, S. L., Antithrombins Southport (Leu 99 to Val) and Vienna (Gln 118 to Pro): two novel antithrombin variants with abnormal heparin binding. *Br J Haematol* **1995**, 89, (3), 602-9.
7. Arocas, V.; Bock, S. C.; Olson, S. T.; Bjork, I., The role of Arg46 and Arg47 of antithrombin in heparin binding. *Biochemistry* **1999**, 38, (31), 10196-204.
8. Martinez-Martinez, I.; Navarro-Fernandez, J.; Ostergaard, A.; Gutierrez-Gallego, R.; Padilla, J.; Bohdan, N.; Minano, A.; Pascual, C.; Martinez, C.; de la Morena-Barrio, M. E.; Aguila, S.; Pedersen, S.; Kristensen, S. R.; Vicente, V.; Corral, J., Amelioration of the severity of heparin-binding antithrombin mutations by posttranslational mosaicism. *Blood* **2012**, 120, (4), 900-4.
9. Olds, R. J.; Lane, D. A.; Caso, R.; Panico, M.; Morris, H. R.; Sas, G.; Dawes, J.; Thein, S. L., Antithrombin III Budapest: a single amino acid substitution (429Pro to Leu) in a region highly conserved in the serpin family. *Blood* **1992**, 79, (5), 1206-12.
10. Tanaka, Y.; Ueda, K.; Ozawa, T.; Sakuragawa, N.; Yokota, S.; Sato, R.; Okamura, S.; Morita, M.; Imanaka, T., Intracellular accumulation of antithrombin Morioka (C95R), a novel mutation causing type I antithrombin deficiency. *J Biol Chem* **2002**, 277, (52), 51058-67.
11. Kurihara, M.; Watanabe, K.; Inoue, S.; Wada, Y.; Ono, M.; Wakiyama, M.; Iida, H.; Kinoshita, S.; Hamasaki, N., Characterization of two novel mutations of the antithrombin gene observed in Japanese thrombophilic patients. *Thromb Res* **2005**, 115, (5), 351-8.
12. Mori, S.; Yamanouchi, J.; Okamoto, K.; Hato, T.; Yasukawa, M., A novel frameshift mutation leading to inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* **2017**, 28, (2), 189-192.
13. Kyotani, M.; Okumura, K.; Takagi, A.; Murate, T.; Yamamoto, K.; Matsushita, T.; Sugimura, M.; Kanayama, N.; Kobayashi, T.; Saito, H.; Kojima, T., Molecular basis of antithrombin deficiency in four Japanese patients with antithrombin gene abnormalities including two novel mutations. *Am J Hematol* **2007**, 82, (8), 702-5.
14. Wang, W. B.; Fu, Q. H.; Ding, Q. L.; Zhou, R. F.; Wu, W. M.; Hu, Y. Q.; Wang, X. F.; Yan, L. X.; Wang, Z. Y.; Wang, H. L., Characterization of molecular defect of 13387-9delG mutated antithrombin in inherited type I antithrombin deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* **2005**, 16, (2), 149-55.

15. Corral, J.; de la Morena-Barrio, M. E.; Vicente, V., The genetics of antithrombin. *Thromb Res* **2018**, 169, 23-29.
16. Perry, D. J.; Carrell, R. W., Molecular genetics of human antithrombin deficiency. *Hum Mutat* **1996**, 7, (1), 7-22.
17. Dementiev, A.; Petitou, M.; Herbert, J. M.; Gettins, P. G., The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, 11, (9), 863-7.
18. Li, W.; Johnson, D. J.; Esmon, C. T.; Huntington, J. A., Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin. *Nat Struct Mol Biol* **2004**, 11, (9), 857-62.
19. Bjork, I.; Jackson, C. M.; Jornvall, H.; Lavine, K. K.; Nordling, K.; Salsgiver, W. J., The active site of antithrombin. Release of the same proteolytically cleaved form of the inhibitor from complexes with factor IXa, factor Xa, and thrombin. *J Biol Chem* **1982**, 257, (5), 2406-11.
20. Broze, G. J., Jr.; Likert, K.; Higuchi, D., Inhibition of factor VIIa/tissue factor by antithrombin III and tissue factor pathway inhibitor. *Blood* **1993**, 82, (5), 1679-81.
21. Rao, L. V.; Rapaport, S. I.; Hoang, A. D., Binding of factor VIIa to tissue factor permits rapid antithrombin III/heparin inhibition of factor VIIa. *Blood* **1993**, 81, (10), 2600-7.
22. Lawson, J. H.; Butenas, S.; Ribarik, N.; Mann, K. G., Complex-dependent inhibition of factor VIIa by antithrombin III and heparin. *J Biol Chem* **1993**, 268, (2), 767-70.
23. Rezaie, A. R.; Giri, H., Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* **2020**, 18, (12), 3142-3153.
24. de Agostini, A. I.; Watkins, S. C.; Slayter, H. S.; Youssoufian, H.; Rosenberg, R. D., Localization of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans in vascular endothelium: antithrombin binding on cultured endothelial cells and perfused rat aorta. *J Cell Biol* **1990**, 111, (3), 1293-304.
25. Yamauchi, T.; Umeda, F.; Inoguchi, T.; Nawata, H., Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, 163, (3), 1404-11.
26. O'Reilly, M. S.; Pirie-Shepherd, S.; Lane, W. S.; Folkman, J., Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* **1999**, 285, (5435), 1926-8.
27. Zhang, W.; Chuang, Y. J.; Jin, T.; Swanson, R.; Xiong, Y.; Leung, L.; Olson, S. T., Antiangiogenic antithrombin induces global changes in the gene expression profile of endothelial cells. *Cancer Res* **2006**, 66, (10), 5047-55.
28. Zhang, W.; Chuang, Y. J.; Swanson, R.; Li, J.; Seo, K.; Leung, L.; Lau, L. F.; Olson, S. T., Antiangiogenic antithrombin down-regulates the expression of the proangiogenic heparan sulfate proteoglycan, perlecan, in endothelial cells. *Blood* **2004**, 103, (4), 1185-91.
29. Zhang, W.; Swanson, R.; Izaguirre, G.; Xiong, Y.; Lau, L. F.; Olson, S. T., The heparin-binding site of antithrombin is crucial for antiangiogenic activity. *Blood* **2005**, 106, (5), 1621-8.
30. Papareddy, P.; Rossnagel, M.; Doreen Hollwedel, F.; Kilic, G.; Veerla, S.; Naudin, C.; Smeds, E.; Westman, J.; Martinez-Martinez, I.; Egesten, A.; de la Morena-Barrio, M. E.; Corral, J.; Linder, A.; Artoni, A.; Abbattista, M.; Novembrino, C.; Herbert Brakebusch, C.; Martinelli, I.; Kasetty, G.; Herwald, H., A human antithrombin isoform dampens inflammatory responses and protects from organ damage during bacterial infection. *Nat Microbiol* **2019**, 4, (12), 2442-2455.
31. Bae, J. S.; Rezaie, A. R., Mutagenesis studies toward understanding the intracellular signaling mechanism of antithrombin. *J Thromb Haemost* **2009**, 7, (5), 803-10.

32. Streusand, V. J.; Bjork, I.; Gettins, P. G.; Petitou, M.; Olson, S. T., Mechanism of acceleration of antithrombin-proteinase reactions by low affinity heparin. Role of the antithrombin binding pentasaccharide in heparin rate enhancement. *J Biol Chem* **1995**, 270, (16), 9043-51.
33. Oelschlager, C.; Romisch, J.; Staubitz, A.; Stauss, H.; Leithauser, B.; Tillmanns, H.; Holschermann, H., Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood* **2002**, 99, (11), 4015-20.
34. De Stefano, V.; Simioni, P.; Rossi, E.; Tormene, D.; Za, T.; Pagnan, A.; Leone, G., The risk of recurrent venous thromboembolism in patients with inherited deficiency of natural anticoagulants antithrombin, protein C and protein S. *Haematologica* **2006**, 91, (5), 695-8.
35. Rosenberg, R. D., Actions and interactions of antithrombin and heparin. *N Engl J Med* **1975**, 292, (3), 146-51.
36. Kottke-Marchant, K.; Duncan, A., Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* **2002**, 126, (11), 1326-36.
37. Mateo, J.; Oliver, A.; Borrell, M.; Sala, N.; Fontcuberta, J., Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost* **1997**, 77, (3), 444-51.
38. Heijboer, H.; Brandjes, D. P.; Buller, H. R.; Sturk, A.; ten Cate, J. W., Deficiencies of coagulation-inhibiting and fibrinolytic proteins in outpatients with deep-vein thrombosis. *N Engl J Med* **1990**, 323, (22), 1512-6.
39. De Stefano, V.; Finazzi, G.; Mannucci, P. M., Inherited thrombophilia: pathogenesis, clinical syndromes, and management. *Blood* **1996**, 87, (9), 3531-44.
40. de la Morena-Barrio, B.; Orlando, C.; de la Morena-Barrio, M. E.; Vicente, V.; Jochmans, K.; Corral, J., Incidence and features of thrombosis in children with inherited antithrombin deficiency. *Haematologica* **2019**, 104, (12), 2512-2518.
41. Young, G.; Albisetti, M.; Bonduel, M.; Brandao, L.; Chan, A.; Friedrichs, F.; Goldenberg, N. A.; Grabowski, E.; Heller, C.; Journeycake, J.; Kenet, G.; Krumpel, A.; Kurnik, K.; Lubetsky, A.; Male, C.; Manco-Johnson, M.; Mathew, P.; Monagle, P.; van Ommen, H.; Simioni, P.; Svirin, P.; Tormene, D.; Nowak-Gottl, U., Impact of inherited thrombophilia on venous thromboembolism in children: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Circulation* **2008**, 118, (13), 1373-82.
42. Ishiguro, A.; Ezinne, C. C.; Michihata, N.; Nakadate, H.; Manabe, A.; Taki, M.; Shima, M., Pediatric thromboembolism: a national survey in Japan. *Int J Hematol* **2017**, 105, (1), 52-58.
43. Harmanci, O.; Ersoy, O.; Gurgey, A.; Buyukasik, Y.; Gedikoglu, G.; Balkanci, F.; Sivri, B.; Bayraktar, Y., The etiologic distribution of thrombophilic factors in chronic portal vein thrombosis. *J Clin Gastroenterol* **2007**, 41, (5), 521-7.
44. Ates, O., The deficiencies of protein C, protein S and antithrombin III in patients with retinal vein occlusion: a Turkish sample. *Clin Lab Haematol* **2006**, 28, (6), 391-2.
45. Calcaterra, D.; Martin, J. T.; Ferneini, A. M.; De Natale, R. W., Acute mesenteric and aortic thrombosis associated with antithrombin deficiency: a rare occurrence. *Ann Vasc Surg* **2010**, 24, (3), 415 e5-7.
46. Shibahara, K.; Tatsuta, K.; Orita, H.; Yonemura, T.; Kohno, H., Superior mesenteric and portal vein thrombosis caused by congenital antithrombin III deficiency: report of a case. *Surg Today* **2007**, 37, (4), 308-10.
47. Santangeli, P.; Sestito, A., Acute left atrial thrombosis during anticoagulant therapy in a patient with antithrombin deficiency. *Acta Cardiol* **2008**, 63, (5), 635-7.
48. Tu, C. M.; Hsueg, C. H.; Chu, K. M.; Cheng, S. M.; Tsao, T. P., Simultaneous thromboses of double coronary arteries in a young male with antithrombin III deficiency. *Am J Emerg Med* **2009**, 27, (9), 1169 e3-6.

49. Peovska, I.; Maksimovic, J.; Kalpak, O.; Pejkov, H.; Bosevski, M., Recurrent myocardial infarction in a young football player with antithrombin III deficiency. *Cardiol J* **2008**, *15*, (5), 463-6.
50. Baiges, A.; de la Morena-Barrio, M. E.; Turon, F.; Minano, A.; Alberto Ferrusquia, J.; Magaz, M.; Reverter, J. C.; Vicente, V.; Hernandez-Gea, V.; Corral, J.; Garcia-Pagan, J. C., Congenital antithrombin deficiency in patients with splanchnic vein thrombosis. *Liver Int* **2020**, *40*, (5), 1168-1177.
51. Gindele, R.; Selmeczi, A.; Oláh, Z.; Ilonczai, P.; Pfliegler, G.; Marján, E.; Nemes, L.; Nagy, Á.; Losonczy, H.; Mitic, G.; Kovac, M.; Balogh, G.; Komáromi, I.; Schlammadinger, Á.; Rázsó, K.; Boda, Z.; Muszbek, L.; Bereczky, Z., Clinical and laboratory characteristics of antithrombin deficiencies: A large cohort study from a single diagnostic center. *Thromb Res* **2017**, *160*, 119-128.
52. Sekiya, A.; Taniguchi, F.; Yamaguchi, D.; Kamijima, S.; Kaneko, S.; Katsu, S.; Hanamura, M.; Takata, M.; Nakano, H.; Asakura, H.; Ohtake, S.; Morishita, E., Causative genetic mutations for antithrombin deficiency and their clinical background among Japanese patients. *Int J Hematol* **2017**, *105*, (3), 287-294.
53. Luxembourg, B.; Pavlova, A.; Geisen, C.; Spannagl, M.; Bergmann, F.; Krause, M.; Alesci, S.; Seifried, E.; Lindhoff-Last, E., Impact of the type of SERPINC1 mutation and subtype of antithrombin deficiency on the thrombotic phenotype in hereditary antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* **2014**, *111*, (2), 249-57.
54. Wang, D.; Cui, G.; Hu, S.; Wang, D. W., Subtypes of SERPINC1 mutations and the thrombotic phenotype of inherited antithrombin deficient individuals in Chinese Han population. *Blood Cells Mol Dis* **2016**, *62*, 38-41.
55. Alhenc-Gelas, M.; Plu-Bureau, G.; Hugon-Rodin, J.; Picard, V.; Horellou, M. H.; Thrombophilia, G. s. g. o. G., Thrombotic risk according to SERPINC1 genotype in a large cohort of subjects with antithrombin inherited deficiency. *Thromb Haemost* **2017**, *117*, (6), 1040-1051.
56. Kjaergaard, A. D.; Larsen, O. H.; Hvas, A. M.; Nissen, P. H., SERPINC1 variants causing hereditary antithrombin deficiency in a Danish population. *Thromb Res* **2019**, *175*, 68-75.
57. Puurunen, M.; Salo, P.; Engelbarth, S.; Javela, K.; Perola, M., Type II antithrombin deficiency caused by a founder mutation Pro73Leu in the Finnish population: clinical picture. *J Thromb Haemost* **2013**, *11*, (10), 1844-9.
58. Orlando, C.; Heylen, O.; Lissens, W.; Jochmans, K., Antithrombin heparin binding site deficiency: A challenging diagnosis of a not so benign thrombophilia. *Thromb Res* **2015**, *135*, (6), 1179-85.
59. Gindele, R.; Olah, Z.; Ilonczai, P.; Speker, M.; Udvari, A.; Selmeczi, A.; Pfliegler, G.; Marjan, E.; Kovacs, B.; Boda, Z.; Muszbek, L.; Bereczky, Z., Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort. *J Thromb Haemost* **2016**, *14*, (4), 704-15.
60. Bereczky, Z.; Gindele, R.; Fiatal, S.; Speker, M.; Miklos, T.; Balogh, L.; Mezei, Z.; Szabo, Z.; Adany, R., Age and Origin of the Founder Antithrombin Budapest 3 (p.Leu131Phe) Mutation; Its High Prevalence in the Roma Population and Its Association With Cardiovascular Diseases. *Front Cardiovasc Med* **2020**, *7*, 617711.
61. Bereczky, Z.; Gindele, R.; Speker, M.; Kallai, J., Deficiencies of the Natural Anticoagulants - Novel Clinical Laboratory Aspects of Thrombophilia Testing. *EJIFCC* **2016**, *27*, (2), 130-46.
62. Perry, D. J.; Daly, M. E.; Tait, R. C.; Walker, I. D.; Brown, K.; Beauchamp, N. J.; Preston, F. E.; Gyde, H.; Harper, P. L.; Carrell, R. W., Antithrombin cambridge II (Ala384Ser): clinical, functional and haplotype analysis of 18 families. *Thromb Haemost* **1998**, *79*, (2), 249-53.

63. Corral, J.; Hernandez-Espinosa, D.; Soria, J. M.; Gonzalez-Conejero, R.; Ordonez, A.; Gonzalez-Porras, J. R.; Perez-Ceballos, E.; Lecumberri, R.; Sanchez, I.; Roldan, V.; Mateo, J.; Minano, A.; Gonzalez, M.; Alberca, I.; Fontcuberta, J.; Vicente, V., Antithrombin Cambridge II (A384S): an underestimated genetic risk factor for venous thrombosis. *Blood* **2007**, 109, (10), 4258-63.
64. Kovacs, B.; Bereczky, Z.; Olah, Z.; Gindele, R.; Kerenyi, A.; Selmeczi, A.; Boda, Z.; Muszbek, L., The superiority of anti-FXa assay over anti-FIIa assay in detecting heparin-binding site antithrombin deficiency. *Am J Clin Pathol* **2013**, 140, (5), 675-9.
65. Kovacs, B.; Bereczky, Z.; Selmeczi, A.; Gindele, R.; Olah, Z.; Kerenyi, A.; Boda, Z.; Muszbek, L., Progressive chromogenic anti-factor Xa assay and its use in the classification of antithrombin deficiencies. *Clin Chem Lab Med* **2014**, 52, (12), 1797-806.
66. Richards, S.; Aziz, N.; Bale, S.; Bick, D.; Das, S.; Gastier-Foster, J.; Grody, W. W.; Hegde, M.; Lyon, E.; Spector, E.; Voelkerding, K.; Rehm, H. L.; Committee, A. L. Q. A., Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* **2015**, 17, (5), 405-24.
67. Sas, G.; Pepper, D. S.; Cash, J. D., Investigations on antithrombin III in normal plasma and serum. *Br J Haematol* **1975**, 30, (3), 265-72.
68. Johnson, D. J.; Langdown, J.; Li, W.; Luis, S. A.; Baglin, T. P.; Huntington, J. A., Crystal structure of monomeric native antithrombin reveals a novel reactive center loop conformation. *J Biol Chem* **2006**, 281, (46), 35478-86.
69. Johnson, D. J.; Huntington, J. A., Crystal structure of antithrombin in a heparin-bound intermediate state. *Biochemistry* **2003**, 42, (29), 8712-9.
70. Guvench, O.; Mallajosyula, S. S.; Raman, E. P.; Hatcher, E.; Vanommeslaeghe, K.; Foster, T. J.; Jamison, F. W., 2nd; Mackerell, A. D., Jr., CHARMM additive all-atom force field for carbohydrate derivatives and its utility in polysaccharide and carbohydrate-protein modeling. *J Chem Theory Comput* **2011**, 7, (10), 3162-3180.
71. Mallajosyula, S. S.; Guvench, O.; Hatcher, E.; Mackerell, A. D., Jr., CHARMM Additive All-Atom Force Field for Phosphate and Sulfate Linked to Carbohydrates. *J Chem Theory Comput* **2012**, 8, (2), 759-776.
72. Brennan, S. O.; George, P. M.; Jordan, R. E., Physiological variant of antithrombin-III lacks carbohydrate sidechain at Asn 135. *FEBS Lett* **1987**, 219, (2), 431-6.
73. Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L., 3rd; MacKerell, A. D., Jr.; Klauda, J. B.; Im, W., CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J Chem Theory Comput* **2016**, 12, (1), 405-13.
74. Jo, S.; Cheng, X.; Lee, J.; Kim, S.; Park, S. J.; Patel, D. S.; Beaven, A. H.; Lee, K. I.; Rui, H.; Park, S.; Lee, H. S.; Roux, B.; MacKerell, A. D., Jr.; Klauda, J. B.; Qi, Y.; Im, W., CHARMM-GUI 10 years for biomolecular modeling and simulation. *J Comput Chem* **2017**, 38, (15), 1114-1124.
75. Park, S. J.; Lee, J.; Patel, D. S.; Ma, H.; Lee, H. S.; Jo, S.; Im, W., Glycan Reader is improved to recognize most sugar types and chemical modifications in the Protein Data Bank. *Bioinformatics* **2017**, 33, (19), 3051-3057.
76. Miao, Y.; Feher, V. A.; McCammon, J. A., Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J Chem Theory Comput* **2015**, 11, (8), 3584-3595.

77. Salomon-Ferrer, R.; Gotz, A. W.; Poole, D.; Le Grand, S.; Walker, R. C., Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. *J Chem Theory Comput* **2013**, 9, (9), 3878-88.
78. York, D. M.; Wlodawer, A.; Pedersen, L. G.; Darden, T. A., Atomic-level accuracy in simulations of large protein crystals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, 91, (18), 8715-8.
79. Ichiye, T.; Karplus, M., Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal mode simulations. *Proteins* **1991**, 11, (3), 205-17.
80. Roe, D. R.; Cheatham, T. E., 3rd, PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J Chem Theory Comput* **2013**, 9, (7), 3084-95.
81. Kabsch, W.; Sander, C., Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **1983**, 22, (12), 2577-637.
82. Adzhubei, I.; Jordan, D. M.; Sunyaev, S. R., Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet* **2013**, Chapter 7, Unit7.20.
83. Adzhubei, I. A.; Schmidt, S.; Peshkin, L.; Ramensky, V. E.; Gerasimova, A.; Bork, P.; Kondrashov, A. S.; Sunyaev, S. R., A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* **2010**, 7, (4), 248-9.
84. Pejaver, V.; Urresti, J.; Lugo-Martinez, J.; Pagel, K. A.; Lin, G. N.; Nam, H. J.; Mort, M.; Cooper, D. N.; Sebat, J.; Iakoucheva, L. M.; Mooney, S. D.; Radivojac, P., Inferring the molecular and phenotypic impact of amino acid variants with MutPred2. *Nat Commun* **2020**, 11, (1), 5918.
85. Capriotti, E.; Calabrese, R.; Casadio, R., Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* **2006**, 22, (22), 2729-34.
86. Sim, N. L.; Kumar, P.; Hu, J.; Henikoff, S.; Schneider, G.; Ng, P. C., SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* **2012**, 40, (Web Server issue), W452-7.
87. Schwarz, J. M.; Rödelsperger, C.; Schuelke, M.; Seelow, D., MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* **2010**, 7, (8), 575-6.
88. Girolami, A.; Fabris, F.; Cappellato, G.; Sainati, L.; Boeri, G., Antithrombin III (AT III) Padua2: a "new" congenital abnormality with defective heparin co-factor activities but no thrombotic disease. *Blut* **1983**, 47, (2), 93-103.
89. Fitton, H. L.; Skinner, R.; Dafforn, T. R.; Jin, L.; Pike, R. N., The N-terminal segment of antithrombin acts as a steric gate for the binding of heparin. *Protein Sci* **1998**, 7, (3), 782-8.
90. Balogh, G.; Komaromi, I.; Bereczky, Z., The mechanism of high affinity pentasaccharide binding to antithrombin, insights from Gaussian accelerated molecular dynamics simulations. *J Biomol Struct Dyn* **2020**, 38, (16), 4718-4732.
91. Lange, O. F.; Grubmuller, H., Generalized correlation for biomolecular dynamics. *Proteins* **2006**, 62, (4), 1053-61.
92. Luxembourg, B.; D'Souza, M.; Körber, S.; Seifried, E., Prediction of the pathogenicity of antithrombin sequence variations by in silico methods. *Thrombosis Research* **2015**, 135, (2), 404-409.
93. Aguila, S.; Noto, R.; Luengo-Gil, G.; Espin, S.; Bohdan, N.; de la Morena-Barrio, M. E.; Penas, J.; Rodenas, M. C.; Vicente, V.; Corral, J.; Manno, M.; Martinez-Martinez, I., N-Glycosylation as a Tool to Study Antithrombin Secretion, Conformation, and Function. *Int J Mol Sci* **2021**, 22, (2).
94. de la Morena-Barrio, M. E.; Suchon, P.; Jacobsen, E. M.; Iversen, N.; Minano, A.; de la Morena-Barrio, B.; Bravo-Perez, C.; Padilla, J.; Cifuentes, R.; Asenjo, S.; Deleuze, J. F.; Tregouet, D. A.; Lozano, M. L.; Vicente, V.; Sandset, P. M.; Morange, P. E.;

- Corral, J., Two SERPINC1 variants affecting N-glycosylation of Asn224 cause severe thrombophilia not detected by functional assays. *Blood* **2022**, 140, (2), 140-151.
95. Aguila, S.; Martinez-Martinez, I.; Dichiara, G.; Gutierrez-Gallego, R.; Navarro-Fernandez, J.; Vicente, V.; Corral, J., Increased N-glycosylation efficiency by generation of an aromatic sequon on N135 of antithrombin. *PLoS One* **2014**, 9, (12), e114454.
 96. Chang, J. Y.; Tran, T. H., Antithrombin III Basel. Identification of a Pro-Leu substitution in a hereditary abnormal antithrombin with impaired heparin cofactor activity. *J Biol Chem* **1986**, 261, (3), 1174-6.
 97. Gindele, R.; Oláh, Z.; Ilonczai, P.; Speker, M.; Udvari, Á.; Selmeczi, A.; Pfliegler, G.; Marján, E.; Kovács, B.; Boda, Z.; Muszbek, L.; Bereczky, Z., Founder effect is responsible for the p.Leu131Phe heparin-binding-site antithrombin mutation common in Hungary: phenotype analysis in a large cohort. *J Thromb Haemost* **2016**, 14, (4), 704-15.
 98. Kraft, J.; Sunder-Plassmann, R.; Mannhalter, C.; Quehenberger, P.; Tews, G.; Langer, M.; Pabinger, I., Women with homozygous AT deficiency type II heparin-binding site (HBS) are at high risk of pregnancy loss and pregnancy complications. *Ann Hematol* **2017**, 96, (6), 1023-1031.
 99. Vossen, C. Y.; Conard, J.; Fontcuberta, J.; Makris, M.; FJ, V. D. M.; Pabinger, I.; Palareti, G.; Preston, F. E.; Scharrer, I.; Souto, J. C.; Svensson, P.; Walker, I. D.; Rosendaal, F. R., Risk of a first venous thrombotic event in carriers of a familial thrombophilic defect. The European Prospective Cohort on Thrombophilia (EPCOT). *J Thromb Haemost* **2005**, 3, (3), 459-64.
 100. Zhou, R. F.; Fu, Q. H.; Wang, W. B.; Xie, S.; Dai, J.; Ding, Q. L.; Wang, X. F.; Wang, H. L.; Wang, Z. Y., Molecular mechanisms of antithrombin deficiency in two Chinese families. One novel and one recurrent point mutation in the antithrombin gene causing venous thrombosis. *Thromb Haemost* **2005**, 94, (6), 1172-6.
 101. Homola, J., Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species. *Chem Rev* **2008**, 108, (2), 462-93.
 102. Zhao, J.; Liu, X.; Malhotra, A.; Li, Q.; Zhang, F.; Linhardt, R. J., Novel method for measurement of heparin anticoagulant activity using SPR. *Anal Biochem* **2017**, 526, 39-42.
 103. Zhang, F.; Zhang, Z.; Lin, X.; Beenken, A.; Eliseenkova, A. V.; Mohammadi, M.; Linhardt, R. J., Compositional analysis of heparin/heparan sulfate interacting with fibroblast growth factor.fibroblast growth factor receptor complexes. *Biochemistry* **2009**, 48, (35), 8379-86.
 104. Zhang, F.; Aguilera, J.; Beaudet, J. M.; Xie, Q.; Lerch, T. F.; Davulcu, O.; Colon, W.; Chapman, M. S.; Linhardt, R. J., Characterization of interactions between heparin/glycosaminoglycan and adeno-associated virus. *Biochemistry* **2013**, 52, (36), 6275-85.
 105. Zhao, J.; Liu, X.; Kao, C.; Zhang, E.; Li, Q.; Zhang, F.; Linhardt, R. J., Kinetic and Structural Studies of Interactions between Glycosaminoglycans and Langerin. *Biochemistry* **2016**, 55, (32), 4552-9.
 106. Mirow, N.; Zimmermann, B.; Maleszka, A.; Knobl, H.; Tenderich, G.; Koerfer, R.; Herberg, F. W., Plasma protein binding properties to immobilized heparin and heparin-albumin conjugate. *Artif Organs* **2007**, 31, (6), 466-71.
 107. Miao, Y.; Bhattarai, A.; Wang, J., Ligand Gaussian Accelerated Molecular Dynamics (LiGaMD): Characterization of Ligand Binding Thermodynamics and Kinetics. *J Chem Theory Comput* **2020**, 16, (9), 5526-5547.
 108. Fitches, A. C.; Appleby, R.; Lane, D. A.; De Stefano, V.; Leone, G.; Olds, R. J., Impaired cotranslational processing as a mechanism for type I antithrombin deficiency. *Blood* **1998**, 92, (12), 4671-6.

109. Jochmans, K.; Lissens, W.; Seneca, S.; Capel, P.; Chatelain, B.; Meeus, P.; Osselaer, J. C.; Peerlinck, K.; Seghers, J.; Slacmeulder, M.; Stibbe, J.; van de Loo, J.; Vermynen, J.; Liebaers, I.; De Waele, M., The molecular basis of antithrombin deficiency in Belgian and Dutch families. *Thromb Haemost* **1998**, 80, (3), 376-81.
110. Bravo-Perez, C.; de la Morena-Barrio, M. E.; de la Morena-Barrio, B.; Minano, A.; Padilla, J.; Cifuentes, R.; Garrido, P.; Vicente, V.; Corral, J., Molecular and clinical characterization of transient antithrombin deficiency: A new concept in congenital thrombophilia. *Am J Hematol* **2022**, 97, (2), 216-225.
111. Hetz, C.; Zhang, K. Z.; Kaufman, R. J., Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2020**, 21, (8), 421-438.
112. Imai, Y.; Nagaya, S.; Araiso, Y.; Meguro-Horike, M.; Togashi, T.; Horike, S. I.; Kawasaki, H.; Morishita, E., Functional analysis of two abnormal antithrombin proteins with different intracellular kinetics. *Thrombosis Research* **2023**, 230, 18-26.
113. Nagaizumi, K.; Inaba, H.; Amano, K.; Suzuki, M.; Arai, M.; Fukutake, K., Five novel and four recurrent point mutations in the antithrombin gene causing venous thrombosis. *Int J Hematol* **2003**, 78, (1), 79-83.
114. Martinez-Martinez, I.; Ordonez, A.; Navarro-Fernandez, J.; Perez-Lara, A.; Gutierrez-Gallego, R.; Giraldo, R.; Martinez, C.; Llop, E.; Vicente, V.; Corral, J., Antithrombin Murcia (K241E) causing antithrombin deficiency: a possible role for altered glycosylation. *Haematologica* **2010**, 95, (8), 1358-65.
115. Luxembourg, B.; Delev, D.; Geisen, C.; Spannagl, M.; Krause, M.; Miesbach, W.; Heller, C.; Bergmann, F.; Schmeink, U.; Grossmann, R.; Lindhoff-Last, E.; Seifried, E.; Oldenburg, J.; Pavlova, A., Molecular basis of antithrombin deficiency. *Thromb Haemost* **2011**, 105, (4), 635-46.
116. Ordonez, A.; Snapp, E. L.; Tan, L.; Miranda, E.; Marciniak, S. J.; Lomas, D. A., Endoplasmic reticulum polymers impair luminal protein mobility and sensitize to cellular stress in alpha1-antitrypsin deficiency. *Hepatology* **2013**, 57, (5), 2049-60.
117. Jochmans, K.; Lissens, W.; Vervoort, R.; Peeters, S.; De Waele, M.; Liebaers, I., Antithrombin-Gly 424 Arg: a novel point mutation responsible for type 1 antithrombin deficiency and neonatal thrombosis. *Blood* **1994**, 83, (1), 146-51.
118. Corral, J.; Huntington, J. A.; Gonzalez-Conejero, R.; Mushunje, A.; Navarro, M.; Marco, P.; Vicente, V.; Carrell, R. W., Mutations in the shutter region of antithrombin result in formation of disulfide-linked dimers and severe venous thrombosis. *J Thromb Haemost* **2004**, 2, (6), 931-9.
119. Aguila, S.; Navarro-Fernandez, J.; Bohdan, N.; Gutierrez-Gallego, R.; de la Morena-Barrio, M. E.; Vicente, V.; Corral, J.; Martinez-Martinez, I., Role of the C-sheet in the maturation of N-glycans on antithrombin: functional relevance of pleiotropic mutations. *J Thromb Haemost* **2014**, 12, (7), 1131-40.
120. Olds, R. J.; Lane, D. A.; Chowdhury, V.; De Stefano, V.; Leone, G.; Thein, S. L., Complete nucleotide sequence of the antithrombin gene: evidence for homologous recombination causing thrombophilia. *Biochemistry* **1993**, 32, (16), 4216-24.
121. Bravo-Perez, C.; Toderici, M.; Chambers, J. E.; Martinez-Menarguez, J. A.; Garrido-Rodriguez, P.; Perez-Sanchez, H.; de la Morena-Barrio, B.; Padilla, J.; Minano, A.; Cifuentes-Riquelme, R.; Vicente, V.; Lozano, M. L.; Marciniak, S. J.; de la Morena-Barrio, M. E.; Corral, J., Full-length antithrombin frameshift variant with aberrant C-terminus causes endoplasmic reticulum retention with a dominant-negative effect. *JCI Insight* **2022**, 7, (19).

11. Tárgyszavak

antithrombin

antithrombin deficiencia

mutáció analízis

trombózis

genetípus-fenotípus összefüggések

expressziós vizsgálat

in silico módszerek

molekula modellezés

heparin-kötő hely

SPR mérés

antithrombin

antithrombin deficiency

mutation analysis

thrombosis

genotype-phenotype associations

expression study

in silico methods

molecular modelling

heparin-binding site

surface plasmon resonance

12. Köszönetnyilvánítás

Először témavezetőmnek, Dr. Bereczky Zsuzsannának szeretnék köszönetet mondani támogatásáért, szakmai segítségéért, amivel a tudományos publikációk és az értekezés elkészültét támogatta. Hálával tartozom előző témavezetőmnek, Dr. Hársfalvi Jolánnak, aki a tudományos pályán elindított. Köszönettel tartozom jelenlegi munkatársaimnak is, Dr. Lányi Árpádnak, Dr. Gyöngyösi Adriennek és Dr. Korpos Évának, folyamatos biztatásukkal hozzájárultak az értekezés elkészültéhez.

Köszönetet szeretnék mondani a DE ÁOK LMI Klinikai Laboratóriumi Kutató Tanszék összes jelenlegi és volt munkatársának, a kísérletes munkában nyújtott segítségért Sándor Ágnesnek, Tóthné Fedoriska Viktóriának, Haramura Gizellának, Szabó Zsuzsannának és Molnár Évának. Köszönöm közleményeim társszerzőinek alapos munkájukat és segítő javaslataikat. Különösen köszönöm Gindele Rékának, Bogáti Rékának és Pénzes-Daku Krisztinának szakmai és baráti támogatásukat a PhD képzés közös éve alatt és jelenleg is.

Köszönetet mondok családomnak tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért, különösen Férjemnek és három gyermekemnek, akik végig mellettem voltak.

„Orando et Laborando – Imádkozva és dolgozva”

13. Függelék

13.1 Megjelent publikációk listája



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/147/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kállai Judit

Doktori Iskola: Laki Kálmán Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Kállai, J.**, Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Katona, É., Oláh, Z., Ilonczai, P., Boda, Z., Róna-Tas, Á., Nemes, L., Marton, I., Bereczky, Z.: Clinical and Molecular Characterization of Nine Novel Antithrombin Mutations.
Int. J. Mol. Sci. 25 (5), 1-19, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms25052893>
IF: 5.6 (2022)
2. Gindele, R., Péntes-Daku, K., Balogh, G., **Kállai, J.**, Kissné Bogáti, R., Bécsi, B., Erdődi, F., Katona, É., Bereczky, Z.: Investigation of the Differences in Antithrombin to Heparin Binding among Antithrombin Budapest 3, Basel, and Padua Mutations by Biochemical and In Silico Methods.
Biomolecules. 11 (4), 1-18, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biom11040544>
IF: 6.064

További közlemények

3. Szántó, G. T., Fehér, Á., Korpos, É., Gyöngyösi, A., **Kállai, J.**, Mészáros, B., Óvári, K., Lányi, Á., Panyi, G., Varga, Z.: 5-Chloro-2-Guanidinobenzimidazole (CIGBI) Is a Non-Selective Inhibitor of the Human HV1 Channel.
Pharmaceuticals (Basel). 16 (5), 1-15, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph16050656>
IF: 4.6 (2022)
4. Szegedi, K., Szabó, Z., **Kállai, J.**, Király, J., Szabó, E., Bereczky, Z., Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.
J Clin Med. 12 (13), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>
IF: 3.9 (2022)





5. Cozzolino, M., Gyöngyösi, A., Korpos, É., Gogolák, P., Naseem, M. U., **Kállai, J.**, Lányi, Á., Panyi, G.: The Voltage-Gated Hv1 H⁺ Channel Is Expressed in Tumor-Infiltrating Myeloid-Derived Suppressor Cells.
Int. J. Mol. Sci. 24 (7), 1-24, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24076216>
IF: 5.6 (2022)
6. Erdős, M., Mironska, K., Kareva, L., Stavrik, K., Hasani, A., Lányi, Á., **Kállai, J.**, Maródi, L.: A novel mutation in identified in a patient with autosomal recessive agammaglobulinemia: the impact of the J-Project.
Pediatr. Allergy Immunol. 33 (6), 1-7, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/pai.13805>
IF: 4.4
7. Baráth, B., Kissné Bogáti, R., Miklós, T., **Kállai, J.**, Mezei, Z. A., Bereczky, Z., Muszbek, L., Katona, É.: Effect of [alfa]2-plasmin inhibitor heterogeneity on the risk of venous thromboembolism.
Thromb. Res. 203, 110-116, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2021.05.003>
IF: 10.407
8. Erdős, M., Tsumura, M., **Kállai, J.**, Lányi, Á., Nyúl, Z., Balázs, G., Okada, S., Maródi, L.: Novel STAT-3 gain-of-function variant with hypogammaglobulinemia and recurrent infection phenotype.
Clin. Exp. Immunol. 205 (3), 354-362, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cei.13625>
IF: 5.732
9. Gindele, R., Kerényi, A., **Kállai, J.**, Pfliegler, G., Schlamadinger, Á., Szegedi, I., Major, T., Szabó, Z., Bagoly, Z., Kiss, C., Kappelmayer, J., Bereczky, Z.: Resolving Differential Diagnostic Problems in von Willebrand Disease, in Fibrinogen Disorders, in Prekallikrein Deficiency and in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia by Next-Generation Sequencing.
Life (Basel). 11 (3), 1-23, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/life11030202>
IF: 3.251
10. Balogh, L., Katona, É., Mezei, Z. A., **Kállai, J.**, Gindele, R., Édes, I., Muszbek, L., **Papp, Z.**, Bereczky, Z.: Effect of factor XIII levels and polymorphisms on the risk of myocardial infarction in young patients.
Mol. Cell. Biochem. 448 (1-2), 199-209, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-018-3326-8>
IF: 2.884





11. Mezei, Z. A., Katona, É., **Kállai, J.**, Bereczky, Z., Somodi, L., Molnár, É., Kovács, B., Miklós, T., Ajzner, É., Muszbek, L.: Factor XIII levels and factor XIII B subunit polymorphisms in patients with venous thromboembolism.
Thromb. Res. 158, 93-97, 2017.
IF: 2.779
12. Bereczky, Z., Gindele, R., Speker, M., **Kállai, J.**: Deficiencies of the natural anticoagulants: novel clinical laboratory aspects of thrombophilia testing.
EJIFCC. 27 (2), 130-146, 2016.
13. Mezei, Z. A., Katona, É., **Kállai, J.**, Bereczky, Z., Molnár, É., Kovács, B., Ajzner, É., Bagoly, Z., Miklós, T., Muszbek, L.: Regulation of plasma factor XIII levels in healthy individuals; a major impact by subunit B intron K c.1952+144 C>G polymorphism.
Thromb. Res. 148, 101-106, 2016.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.thromres.2016.10.025>
IF: 2.65

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 57,867

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
11,664**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.04.18.



13.2 Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különnyomatai